

Univerzita Karlova v Praze
Pedagogická fakulta
Katedra biologie a environmentálních studií

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Určování pohlaví u fenotypově nerozlišitelných druhů ptáků na příkladu
kalouse ušatého (*Asio otus*)**

**Sex determination of phenotypically undifferentiated bird species focused
on the Long-eared Owl (*Asio otus*)**

Vypracovala: Bc. Kristýna Hlasivcová
Vedoucí práce: RNDr. Jan Řezníček, Ph.D.

Studijní program: Učitelství pro střední školy
Studijní obor: N BI-VZ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma určování pohlaví u fenotypově nerozlišitelných druhů ptáků na příkladu kalouse ušatého (*Asio otus*) vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 2.7. 2015

.....

Bc. Kristýna Hlasivcová

Poděkování

Děkuji především RNDr. Janu Řezníčkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a v neposlední řadě také za trpělivost. Dále děkuji Ing. Petru Mazouchovi, Ph.D. za pomoc při zpracování grafických znázornění, RNDr. Josefu Chytilovi Ph.D. a Věře Aladzasové Příbylové za veškeré poskytnuté informace. Také děkuji všem členům Katedry biologie a environmentálních studií za jejich rady a motivaci, radě studentského grantu za udělení finančních prostředků nezbytných pro řešení této diplomové práce. Současně děkuji všem blízkým za pochopení a podporu při psaní této práce.

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce je zpracovat možnosti určování fenotypově nerozlišitelných druhů ptáků na příkladu kalouse ušatého (*Asio otus*). Oproti jiným druhům sov je tento druh poměrně málo zkoumaný a doposud hledání rozdílů mezi pohlavími nevedlo ke kvantifikovaným výsledkům. Pozornost je věnována charakteristice ptáka nebo mechanismům zbarvení peří. Tato práce představuje metody a zpracovává výsledky zkoumání zbarvení sexuálního dimorfismu. Soustředí se na rozdíly v barvě některých per, jakými jsou křídélko, sekundární letka a spodní část křídla. Z těchto jednotlivých částí práce dále vyhodnocuje barevné rozdíly v pohlaví a navrhuje řešení, které by mohlo pomoci při výzkumu týkajícího se rozpoznání pohlaví kalouse ušatého.

KLÍČOVÁ SLOVA

kalous ušatý (*Asio otus*), pohlaví, samec, samice, peří, barva

ABSTRACT

The aim of the present thesis is to give a comparison on sex determination of phenotypically undifferentiated birds species focused on the Long-eared Owl (*Asio otus*). Compared to other species of owls is relatively a few researches on the Long-eared Owl and researches on sex differences have not led to the quantified results yet. Attention is focused on characteristics and mechanisms of birds coloration. This work includes the methods and results of colour perception and interpretation in sexual dimorphism. It focuses primarily on the differences in color of certain parts of the bird, such as the alula, secondary remiges and lower part of the wing. For those pieces is further evaluating color differences in sex and proposes solutions that could help in further researches on sex determination of the Long-eared Owl.

KEYWORDS

Long-eared Owl (*Asio otus*), sex, male, female, feathers, colour

Obsah

1	Úvod	8
2	Problematika.....	10
2.1	Sledovaný druh	10
2.1.1	Rozdíly mezi juvenilním a adultním šatem	12
2.2	Sexuální dimorfismus	13
2.2.1	Sexuální dimorfismus u ptáků	15
2.3	Ptačí opeření	16
2.3.1	Struktura opeření	16
2.4	Ptačí barevnost.....	18
2.4.1	Fylogeneze zbarvení	18
2.4.2	Chemická a fyzikální podstata zbarvení	20
2.4.2.1	Karotenoidy	20
2.4.2.2	Melanin.....	21
2.4.2.3	Porfyriny.....	23
2.4.2.4	Další zbarvení.....	23
2.5	Tetrachromatismus.....	27
2.6	Odchyt.....	28
2.6.1	Historie odchytu	28
2.6.2	Odchyt do nárazových sítí	28
2.6.3	Kroužkování	31
2.7	Záchranné stanice se zdokumentovaným záznamem výskutu kalouse ušatého ...	33
2.7.1	ORNIS	33
2.7.2	Záchranná stanice hl. m. Prahy pro volně žijící živočichy	33
2.7.3	Ptáci v zajetí.....	34

2.8	Kalouši na letišti	36
2.9	Určování pohlaví pomocí DNA	37
2.9.1	PCR.....	37
2.9.1.1	Historie metody PCR	37
2.9.1.2	Princip a průběh reakce	38
3	Metodika.....	40
3.1	Metody získávání dat	40
3.1.1	Odchyt	40
3.2	Biometrické měření.....	42
3.3	Určování pohlaví kalouse ušatého podle rozdílů ve zbarvení	44
3.3.1	Spektrální analýza barvy	44
3.3.1.1	Spektrální analýza barvy u sekundární letky.....	45
3.3.1.2	Spektrální analýza barvy u křídélka	46
3.3.2	Vyhodnocení barvy pomocí tzv. vzorníku barev.....	47
3.4	Určování pohlaví pomocí DNA	48
3.4.1	PCR.....	49
4	Výsledky.....	52
4.1	Měření PCR	52
4.2	Biometrické měření křídélka	55
4.3	Spektrální analýza barvy.....	57
4.3.1	Spektrální analýza barvy u sekundární letky	57
4.3.2	Spektrální analýza barvy u křídélka	64
4.4	Vyhodnocení barvy pomocí vzorníku barev	67
4.4.1	Vzorník barev u sekundární letky.....	67
4.4.2	Vzorník barev u křídélka	69

4.4.3	Vzorník barev u spodní části křídla	71
5	Diskuze	73
5.1	Výzkumy pohlaví kalouse ušatého na území České republiky.....	73
5.2	Rozdíly barevnosti v pohlaví	74
5.2.1	Křídélko	74
5.2.2	Sekundární letka	76
5.2.3	Spodní část křídla	77
5.2.4	Další části hodnocení barevnosti pohlaví	78
6	Závěr.....	80
7	Použitá literatura.....	81
7.1	Internetové zdroje	88
7.2	Zákonné normy	89
8	Seznam použitých zkratk	90
9	Seznam obrázků.....	91
10	Seznam tabulek.....	92
11	Seznam grafů	92

1 Úvod

Diplomová práce je zaměřena na určování fenotypově nerozlišitelných druhů ptáků na příkladu kalouse ušatého (*Asio otus*). Základní významnou součástí výzkumu zvířat je determinace pohlaví jedince. V případě ptáků zjištění pohlaví přispívá k pochopení populační dynamiky, rozptýlení, demografie, chování nebo evoluční ekologie (Clutton-Brock, 1986 ex. López-López, 2011, Dunn et al. 2001, Newton 1998, 2003). Určování pohlaví je také důležité pro různé programy ochrany v populaci nebo pro reintrodukci ohrožených druhů (Balbontín et al. 2001).

Rozmanitost ve zbarvení ptáků imponuje biologům snad již od nepaměti. Od dob Darwina je význam a funkce barvy ptáků intenzivně diskutována. Ne všichni ptáci jsou charakterističtí pro svůj pohlavní dimorfismus. Téměř u poloviny druhů ptáků dospělci nevykazují morfologické rozdíly nebo jsou tyto rozdíly na úrovni, podle které se pohlaví nedá jednoznačně určit. Pohlavní dimorfismus nemusí být charakterizován jen rozdílnou barvou peří, ale pohlaví jedinců mohou určit například biometrické metody (Del Mar Delgado and Penteriani, 2004). Biometrické metody jsou ale časově i finančně velice nákladné a ne vždy lze demonstrovat statisticky významné rozdíly mezi samcem a samicí. Pokud pohlavní dimorfismus není zjištěn pomocí zbarvení peří, používají se další metody, které k určení pohlaví přispívají. Je to například chování při hnízdění, výskyt hnízdnic nažin a chování během vyvádění mláďat. K určení pohlaví prostřednictvím pozorování chování přispívají i epigamní projevy, zastrasování nepřítele, čepýření na hlavě samců (Řezníček, 1991).

Není mnoho studií, které by se soustředily na určování pohlaví kalouse ušatého. V minulosti se tímto předmětem zabývali například Mlíkovský (1983), Wijnandts (1984), Wide (1970, 1977) nebo Řezníček (1991). Autoři se ve svých publikacích věnují především biometrickým rozdílům mezi samci a samicemi. V současné době se problematikou zabývají především španělští ornitologové, například Martínez et al. (2002). Jejich výsledky však nikdy nevedly ke kvantifikovatelným závěrům.

Tato studie se podrobně zabývá určováním pohlaví na základě porovnávání fenotypových znaků a ověřování přesnosti výsledků pomocí analýzy DNA. Podle Martíneze et al. (2002)

jsou určujícími znaky tmavší zbarvení a sytější rezavohnědá barva na vnitřní straně křídla u samic. Dalším fenotypovým znakem je kresba na křídélku, šířka rezavohnědé barvy na jeho vnějším praporu, sytost a jasně definovaná barva na křídélku a zbarvení vnitřního praporu sekundárních letek. V této práci jsou jednotlivé studované části inspirovány především výzkumy Martinéze et al. (2002).

Hypotéza:

Z empirických studií a literatury je pravděpodobné, že samice kalouse ušatého (*Asio otus*) dosahují sytější barvy. Práce se zaměřuje na jednotlivé měřené prvky (křídélko, sekundární letku a spodní stranu křídla) a zjišťuje, zda jsou rozdíly v barvě těchto částí opeření relevantní.

2 Problematika

2.1 Sledovaný druh

Kalous ušatý (*Asio otus*) patří do řádu sov (*Strigiformes*). Jedná se o druhově poměrně početný řád třídy ptáků složený z více než 200 druhů sov. S výjimkou Antarktidy se různé druhy většinou solitérních nočních živočichů vyskytují na všech kontinentech. K nočnímu způsobu života jsou sovy vybaveny několika adaptacemi, které jim umožňují lov za tmy. Zmíníme například dokonalý sluch, který jim usnadňuje orientaci. Právě sluch mají sovy ze všech druhů ptáků nejlépe vyvinutý, sovy dokáží vnímat zvuky na konci zvukového spektra. Kvůli predáčnímu způsobu obživy byly v minulosti sovy považovány za příbuzné s dravci. Tato teorie byla vyvrácena a v dnešní době jsou pro sovy nejbližší příbuznou skupinou lelkové (Hudec a kol. 1994-2001).

Říše:	živočichové (<i>Animalia</i>)
Kmen:	strunatci (<i>Chordata</i>)
Podkmen:	obratlovci (<i>Vertebrata</i>)
Třída:	ptáci (<i>Aves</i>)
Podtřída:	letci (<i>Neognathae</i>)
Řád:	sovy (<i>Strigiformes</i>)
Čeleď:	puštíkovití (<i>Strigidae</i>)
Rod:	kalous (<i>Asio</i>)
Druh:	kalous ušatý (<i>Asio otus</i>)

Kalous ušatý je hojně rozšířen v palearktické i nearktické části světa (Šťastný a kol., 1996, 2006). Blízce příbuzné druhy se vyskytují i v tropických částech Afriky a Ameriky, kde jsou zpravidla stálým druhem (Hudec a kol. 1983). Kalousi žijící v zeměpisných šířkách střední Evropy jsou z části stálí, přelétaví, z menší části také tažní (Šťastný a kol., 2006). V zimním období tak migrují na české území jedinci ze severu a severovýchodu (Řezníček, 1981). Kalous ušatý je podle sčítání ptáků z roku 1986 naší druhou nejrozšířenější sovou po puštíku obecném (*Strix aluco*). V Atlasu hnízdního rozšíření z roku 2009 (Bejček,

Šťastný 2009) jsou odhady početnosti kalouse ušatého nižší, přesto se řadí na druhé místo za puštíka obecného. Migrací severské populace se však v období od října do počátku března kalous stává jednoznačně nejpočetnější sovou na našem území (Formánek, Škopek 2000).

Areál výskytu je velmi pestrý, obývá lesy, otevřené plochy polí a luk, remízy, skupiny stromů. Vyskytují se i ve větších parcích nebo na hřbitovech (Hudec a kol. 1983, Šťastný, 1996). Poznávacím znakem výskytu kalousů v korunách jehličnatých stromů jsou vývržky, nestrávené zbytky potravy obsahující kosti a srst drobných hlodavců nacházející se pod stromy.

Havní složkou potravy kalousů jsou hraboši polní (*Microtus arvalis*), kteří tvoří až 90 % celkové kořisti (Šťastný a kol., 2006, Hudec a kol. 1983). Dále to mohou být podle podmínek jiní drobní savci a ptáci, obojživelníci i hmyz (Hudec a kol. 1983). Podle Boháče a Michálkové (v Hudec a kol. 1983) složení potravy podléhá sezónním změnám, například během října a listopadu se zvyšuje podíl myšic díky polním pracím.

Kalousové přizpůsobují okolnostem i způsoby hnízdění. Svoje vlastní hnízda si nestaví, ale výhradně se usazují ve starých opuštěných hnízdech dříve obývaných dravci, holuby či krkavcovitými ptáky. Kalousi méně často hnízdí i v dutinách a budkách, výjimečně bylo jejich hnízdo pozorováno i na zemi (Šťastný a kol., 2006).

Podle hnízdních údajů je rozšíření v České republice rovnoměrné a dlouhodobě nepodléhá výrazným změnám. Jeho početní stavy se mění jen v krátkodobém měřítku v závislosti na fázích populačního cyklu hraboše polního (Šťastný a kol., 2006). V letech 1973-1977 byl hnízdní výskyt na našem území v 80 % kvadrátů mezinárodních sčítání (Šťastný a kol., 1996). V období 2001-2003 opadnul tento výskyt na 78 %. Tento pokles však není připisován úbytku jedinců, ale přiznaným nedostatečným obsazením některých kvadrátů. V současné době kalous ušatý spadá v Červeném seznamu do kategorie LC, málo dotčený druh. (Šťastný a kol., 2006).

Kalous ušatý je druh o střední velikosti 35-40 cm, vážící 220-435 g. Má velkou kulatou hlavu s velkýma očima a oranžovou duhovkou (Marks et al. 1994, Šťastný a kol., 1996,

2006). Kalouse dokonale charakterizují výrazná péřová ouška. Někdy může zdánlivě připomínat výrečka malého (*Otus scops*), ale oproti výrečkovi je větší (Šťastný a kol., 1996, 2006) nebo výra velkého (*Bubo bubo*), oproti němu je však kalous výrazně štíhlejší a menší (www.owlinstitute.org) a velikostně připomíná spíše puštíka obecného (*Strix aluco*) (Hudec a kol. 1983). Jeho zbarvení je rezavohnědé s tmavě hnědými skvrnami, které jsou podélně seskupené (Šťastný a kol., 1996, 2006, Hudec a kol. 1983). Mláďata mají na hlavě v prachovém peří hrbolky, což jsou základy per, které se v dospělosti přemění na „ouška“ (Šťastný a kol., 2006).



Obr. 1: Kalous ušatý (*Asio otus*). Foto: www.owlinstitute.org

2.1.1 Rozdíly mezi juvenilním a adultním šatem

Většinu sov v ptačí říši charakterizuje fakt, že šat mladých jedinců nevykazuje oproti dospělým exemplářům významné rozdíly. Avšak u některých sov, například u sovy pálené, lze během prvních dvou až třech let života pozorovat poměrně zásadní barevné odlišnosti. U samců po přepeření ve druhém roce dochází postupně k zesvětlení oproti roku prvnímu, samice nemají tak znatelné rozdíly jako samci (Roulin, 1999).

2.2 Sexuální dimorfismus

Rozdíly mezi samcem a samicí v živočišné i rostlinné říši označujeme jako sexuální dimorfismus neboli pohlavní dvoutvárnost. V rámci jediného biologického druhu se dvě genetické formy liší tvarem těla, zbarvením, velikostí a mnoha dalšími znaky. Sexuální dimorfismus je obvyklý u mnoha živočišných i rostlinných druhů, které se vyznačují odděleným pohlavím, gonochorismem. Vznik mikrogamet u samců a makrogamet u samic je z evolučního hlediska výhodný. Dochází tak k zajištění rozdílného původu genů (Flegr, 2005). Samci a samice se mohou lišit dvěma různými způsoby. Mohou mít odlišné pouze pohlavní orgány a ostatní morfologické znaky mají shodné (Freyer and Wolpoff, 1985). Tyto znaky lze pozorovat zejména u třídy plazů, například u hadů nebo hatérií. Druhou skupinou jsou druhy, na nichž lze pozorovat jasné znaky pohlavní rozdílnosti. Kromě většiny primátů a dalších savců jako jsou třeba sloni či losi sem patří třeba i bezobratlí, například brouci.

Různé formy sexuálního dimorfismu v minulosti zmátl i autora historicky prvního systematického řazení živého světa *Systema Naturae* Carla Linného, který i v rozšiřujícím vydání z roku 1758 nesprávně klasifikoval kachnu divokou jako *Anas platyrhynchos*. Tato kachna (samice) měla hnědé peří s modrým pruhem na křídle. Kachnu s tmavě zelenou hlavou a krkem, modrým křídlem a zelenožlutým zobákem (samce) definoval jako *Anas bochas*. Nedlouho potom však název *Anas bochas* zanikl a obě pohlaví jsou sjednocena stejným druhovým názvem *Anas platyrhynchos* (Andersson, 1994).

Charles Darwin ze svých výzkumů vyvodil, že vývoj pohlavního dimorfismu lze přisuzovat třem důvodům (Hedrick and Temeles, 1989):

- potravní soutěžení mezi pohlavími
- pohlavní role mezi samcem a samicí
- pohlavní výběr

Uvažujeme-li v souladu s genetickým modelem, pohlavní dimorfismus se vyvinul z počátečního stavu monomorfismu. Evoluce sexuální dvoutvárnosti záležela na předmětu zájmu jednotlivého pohlaví. Původ rozdílů mezi samcem a samicí je přisuzován spíš potravnímu soupeření než vlastní genetické korelaci (Hedrick and Temeles, 1989).

Sexuální dimorfismus můžeme rozdělit do dvou skupin podle délky jeho trvání. Dvoutvárnost může být trvalá nebo periodická. Periodická, neboli dočasná, se projevuje v období zvýšené pohlavní aktivity, kdy se projevují nebo alespoň zesilují sekundární pohlavní znaky. Jeden z nejznámějších periodických dimorfismů je barevně nápadný svatební šat některých druhů ryb, obojživelníků a ptáků (Duelmann a Trueb 1994).

Projevy sexuálního dimorfismu se liší v závislosti na věku jedince. V juvenilním období se mláďata podobají svým vzhledem spíše samici. U savců se dá tento rozdíl nejsnadněji demonstrovat na příkladu lvů (*Panthera leo*). U ptáků a často i u ryb, obojživelníků nebo plazů je juvenilní vzhled zpravidla odlišný od podoby adultních jedinců. Příkladem jsou rackovití (*Laridae*) nebo jeřábovití (*Gruidae*) ptáci (Kořínek, 1999).

Velikost těla je považována za nejvýraznější pohlavně dimorfní znak (Frayner and Wolpoff, 1985). Hlavním důvodem pro rozdílnou velikost je reprodukční úspěch. Velikostní dimorfismus slouží jako dobrý model pro pochopení evolučních procesů, protože právě velikost těla patří mezi nejdůležitější kvantitativní znaky organismu. Je také silně korelována s behaviorálními i fyziologickými rysy živočichů (Foellmer, 2014). Různé druhy mají reprodukční úspěch závislý na odlišných faktorech. U většiny savců jsou samci větší, například samci rypouše sloního (*Mirounga leonina*) dorůstají až dvojnásobné velikosti než samice, aby byli zvýhodněni pro souboj s dalšími jedinci o přízeň samice a zvýšili tak pravděpodobnost páření (LeBoeuf and Reiter, 1988). Dalším příkladem je čeleď hvízdalkovitých žab (*Leptodactylidae*). Větší samci mají reprodukční výhodu, neboť samice preferují hlasový projev právě větších samců (Ron, 2008). Další z příkladů je snovačovitý pták náležící do skupiny vdovek, vida kohoutí (*Euplectes progne*). Samice tohoto druhu sexuálně preferují samce s delšími ocasními pery (Andersson, 1982). Naopak u bezobratlých a poikilotermních obratlovců převládá větší velikost samice oproti samci (Foellmer, 2014), známá zejména u klepítkatců (*Chelicerata*) podmenu členovců. Do této skupiny patří ale i například čeleď netopýrovitých (*Vespertilionidae*). Důvodem velikosti je mateřská ochrana embryí a nošení nově vylíhlých netopýrů a zároveň větší plodnost (Hedrick and Temeles, 1989).

2.2.1 Sexuální dimorfismus u ptáků

U ptáků, podobně jako i u dalších obratlovců, se rozdílnost pohlaví projevuje zpravidla ve velikosti nebo vzájemných poměrech těla (Amadon, 1959 ex. Salander, 1966) a barvě peří. Rozdíl barev u jednotlivých pohlaví je dán hlavně frekvencí mimopárových paternit (Owens and Hartley 1998).

Owens a Hartley (1998) konstatují, že pohlavní dimorfismus je zřetelnější především u polygamních živočišných druhů a že monogamní druhy jsou často monomorfní. Toto tvrzení však nelze paušalizovat, neboť víme, že v třídě ptáků existují i monomorfní druhy s polygamními prvky chování. Samici vedou k pohlavnímu výběru prozatím nedokonale zmapované a nedefinované sexuální preference. Møller (1988) představuje teorii, že samice při výběru uvažují o počtu potenciálních potomků, u nichž se v dospělosti vyvinou podobné ozdoby jako u jejich otců a potomci budou mít výhodu větší pravděpodobnosti kopulace. Tyto poznatky potvrzuje na příkladu vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*). Samci tohoto druhu s uměle prodlouženými ocasními pery se pářili dříve než ostatní a za jednu sezónu zplodili více potomků.

Sexuální dimorfismus se u sov a dravců projevuje především v rozdílné velikosti těl obou pohlaví, samice jsou větší než samci. Lundberg (1986) toto tvrzení staví na výsledcích studie dimorfismu, v níž představuje zřejmou přímou úměru mezi rozpětím křídel a hmotností jedinců obou pohlaví. Z jeho výzkumu vyplynulo, že rozdíl v délce křídla souvisí s potravou. Naproti tomu rozlišení hmotnosti ptáka koreluje se zeměpisnou šířkou, ve které se jedinec primárně nachází. Rozdíly ve velikosti křídel a celkové hmotnosti lze přisuzovat také způsobu rozdělení životních a výchovných rolí. Samec obstarává potravu pro rodinu od chvíle kladení vajec až do doby, kdy jsou mláďata schopná letu. Jeho tělo by tedy mělo být přizpůsobeno efektivnímu lovu, proto má kratší křídla a je drobnější. Samice zodpovědná za péči o mláďata musí být schopna dlouhodobého půstu, proto dosahuje větší váhy. Dalším zřejmým důvodem pro vyšší nároky na mohutnost samice je dosažená lepší adaptace k teplotním výchylkám okolního prostředí v době, kdy se kvůli mláďatům nemůže vzdálit z hnízda. Schopnost výhodné termoregulace je zejména výhodná v době, kdy chov začíná v chladných podmínkách. Mueller (1986) uvádí, že u sov je nejspolehlivějším určením velikosti stanovení váhy.

2.3 Ptačí opeření

Nejtypičtějším znakem pro třídu ptáků je opeření, vývojově nejpodobnější šupinám plazů (Hudec a kol., 1972). Je to specifický tělní pokryv, který je sice svou strukturou nejsložitější, ale zároveň nejlehčí. Jeho další důležitou vlastností je výborná tepelná izolace, díky tomu je kůže ptáků oproti ostatním druhům živočichů velmi tenká (Brooke and Birkhead, 1991, Prum, 1999, Veselovský, 2001).

Rozpoznávání typů a zbarvení opeření je jednou ze základních metod pro poznávání a určování druhů ptáků. Jeho jedinečnost ukazuje mezidruhové rozdíly blízce příbuzných druhů nebo odhaluje specifické vnitrodruhové odlišnosti, například věkové rozdíly (Hudec a kol., 1972).

2.3.1 Struktura opeření

Ptačí opeření se skládá z několika typů per, každý typ má pak různé vlastnosti a je morfologicky neobyčejně proměnlivý. Pera přesto mají některé společné základní rysy. (Hudec a kol., 1972). Typické ptačí pero je rozděleno na dvě části. Osa pera je tvořena stvolem (*scapus*). Dolní část je dutá, nazývaná brk (*calamus*). V horní části je stvol plný a vytváří osten (*rhachis*). Z ostnu vyrůstá prapor (*vexillum*). U letek je vnější část praporu tužší, než část vnitřní. Prapor má kvůli létání specifickou strukturu, aby mohl zůstat celistvý a především pružný. Z ostnu vybíhají postranní větve (*rami*) do obou částí praporu (Hudec a kol., 1972, Veselovský, 2001). Tyto větve jsou navzájem propojeny kratšími paprsky (*radii*). Paprsky jsou obloukovité a směřují směrem dolů nebo mají příchytne háčky a směřují ke špici pera. Tím, že oba druhy mají specifický tvar, zapadají do sebe a dělají pero kompaktní. U některých druhů ptáků, například u sov, vytvářejí větve na okraji vnější části praporu takzvaný hřebínek, který zabraňuje turbulentnímu proudění a umožňuje tak téměř neslyšný let (Brooke and Birkhead, 1991, Hudec a kol., 1972, Veselovský, 2001).

Celkově lze peří rozdělit na několik typů. Jedná se o peří obrysové (*pennae*), které vykazuje typický tvar. Obrysová pera dávají tělu ptáka tvar. Z nich jsou dále diferencovány

další typy. Na křídlech vyrůstají letky (*remiges*). Dále do obrysových per patří pera rýdovací neboli ocasní (*rectrices*) a pera krycí (*tectrices*). Další typy mají jiný tvar a funkci. Nejběžnějším odlišným tvarem jsou pera prachová (*plumae*), tato pera rostou pod krycím peřím a jejich funkcí je především udržování teploty těla. Mezi zbylé typy patří meziprachové (*meniplume*), prachdrobivé (*sempiplumae*), vlasové (*filoplumae*), štetinové (*setae*) a pera s paostnem (*hyporhachis*), který mají vývojově starší taxony, například pštrosi (*Struthioniformes*) nebo hrabaví (*Galliformes*), (Brooke and Birkhead, 1991, Hudec a kol., 1972, Veselovský, 2001).

V průběhu života se šat ptáků mění. Mláďata jsou po vylíhnutí vybavena pouze šatem prachovým (*pulli*). Některé druhy ptáků, jako jsou např. potáplice (*Gaviformes*), vrubozobí (*Anseriformes*) nebo sovy, během časného mládí vymění dvojí prachový šat, přičemž první (*neoptile*) se od druhého (*mesoptile*) zpravidla liší zbarvením (Hudec a kol., 1972, Veselovský, 2001). Platí však, že každý šat mláďat (*juvenilní*) je tvořen prvními obrysovými pery. Doba nošení nedospělého šatu je poměrně rozmanitá, některé z původních letek se mohou na těle udržet i do pozdějšího šatu. U některých nedospělých ptáků se vyskytuje šat *subadultní*, opeření je tehdy smíšené šatem mláďat s šatem dospělých. Tento jev se nachází u většiny velkých ptáků a dravců. Pera dospělých ptáků (*telooptile*) vytváří šat dospělých (*adultní*). U většiny ptáků je tento šat dvojí. V období pohlavní aktivity je nošen šat svatební. V období pohlavního klidu je opeření v šatu prostém, v tomto šatu bývají samci podobní samicím (Hudec a kol., 1972).

2.4 Ptačí barevnost

Ptáci se díky široké rozmanitosti barev řadí mezi nejbarevnější suchozemské živočichy (Stoddard and Prum, 2015). Již od dob Darwina se evoluční biologové snaží vysvětlit pohlavní rozdíly ve velikosti a především peří ptáků (Dunn et al., 2001). V porovnání s většinou savců jsou ptáci schopni vidět širokou škálu barev. Právě tato schopnost souvisí s rozvojem barevného zbarvení peří (Vinther et al., 2008, Stoddard and Prum, 2015). Barva peří není náhodná. Vizuálně zprostředkovává důležité informace s mnoha skrytými významy od kamufláže po ovlivňování výběru partnera, zbarvení pomáhá posoudit schopnosti a kvalitu jedince (Andersson, 1994).

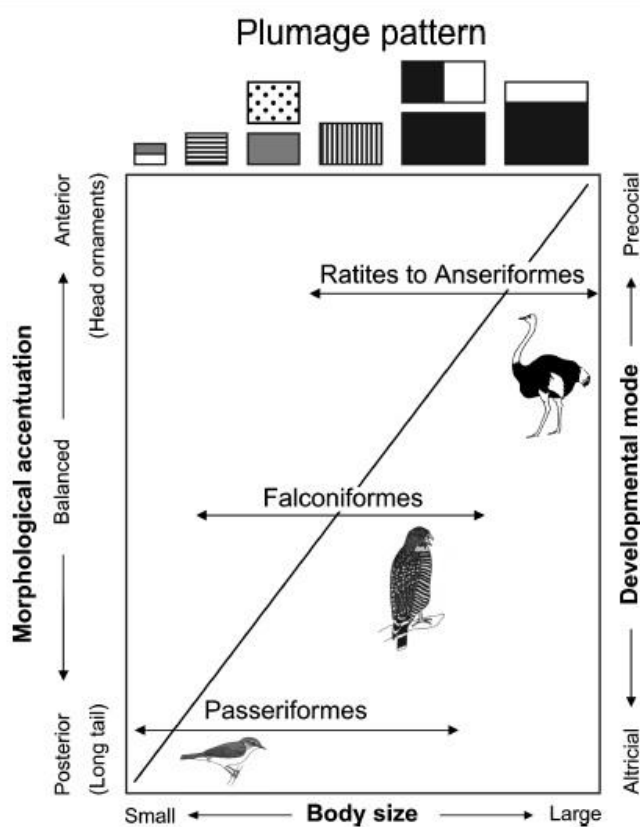
2.4.1 Fylogeneze zbarvení

Nejstarší nalezené a zkoumané fosilní zbytky peří pochází z časového rozmezí od Jury, kdy vznikaly první druhy ptáků, až do konce Terciéru (Davis & Briggs 1995, ex. Vinther et al., 2008). Z výzkumů dochovaných materiálů se ukazuje, že většina zbytků ptačího peří nese uhlíkaté stopy, které na nich zanechaly organely melaninu - melanosomy. Struktura melanosomů pomáhá uchovávat barevný vzor v původním peří a usnadňuje tak výzkum vyhynulých ptáků (Vinther et al., 2008).

Peří ptáků se v průběhu vývoje různě měnilo (Stoddard and Prum, 2015). Samčí zjev však nedosáhnul tolika zásadních změn jako v případě samic, u nichž se barva peří měnila častěji a výrazněji (Bruns, 1997, Price and Eaton, 2014) Burns (1997) toto tvrzení potvrdil při studiu čeledi tangarovitých (*Thraupidae*) ptáků. Jev se dá vysvětlit tím, že přírodní výběr byl založen na samčím výběru nebo prostřednictvím kompetice mezi samicemi (Bruns, 1997). Přejít z dichromatismu na monomorfismus tedy pravděpodobně podměnily právě samice. Přes veškeré pravděpodobné evoluční změny je v současnosti celý pohlavní výběr řízen především samicemi (Price and Eaton, 2014).

Obecně platí, že s rostoucí velikostí těla se mění vzor peří (obr. 2). V souladu s vyobrazením je patrné, že rozdílné charakteristiky zbarvení a struktury peří se řídí vývojovými charakteristikami jednotlivých druhů od nidikolních jedinců až po nidifugní

ptáky. Menší druhy (např. pěvci) mají relativně delší ocas v porovnání s velkými druhy (např. pštrosi), kterým se naopak zvětšuje horní část těla. Řád sov lze zařadit podobně jako dravce do skupiny ptáků, která má vyvážený tvar těla, tedy poměr horní části těla vůči ocasu. Podle těchto indicií Reigner (2008) rozdělil peří do jednotlivých vzorků a vytvořil z toho model. Zleva doprava se jedná o vzory: maskovací, žíhaný, jednobarevný nebo tečkovaný, černý nebo bílý nebo reverzní maskovací.



Obr. 2: Model peří, na kterém lze pozorovat změny ve stavbě těla a zbarvení. Podle: Reigner, 2008

2.4.2 Chemická a fyzikální podstata zbarvení

Fenotypová variabilita živočichů je zkoumána již dlouhou dobu. Zbarvení jednotlivých druhů zvířat totiž poskytuje mnoho modelových rysů pro studium sexuálního výběru nebo během živočišné signalizace či kamufláže (Evans and Sheldon, 2015).

Barevnost peří chrání ptáky před ultrafialovými paprsky slunce, absorbuje infračervené záření a zvyšuje pevnost peří. Viditelné části peří bývají zpravidla barevné a vzorované. Oproti tomu peří, které je skryté, bývá méně barevné (Brooke and Birkhead, 1991).

Fyzikální a chemická podstata zbarvení peří je složitá. Může se jednat o strukturální zbarvení, které je založeno na lomu světla vycházejícího od mikrostruktur keratinových vrstev per v souladu s interferenčními jevy světla. Druhým typem je zbarvení způsobené pigmenty (Fox, 1976, Brush, 1978). Každý z jmenovaných typů vzniku zbarvení produkuje jen určité barvy (McGraw et al., 2004).

Různé studie prokázaly, že dostupnost pigmentu není limitující, avšak také prokázaly, že způsob života nebo různá omezení v příjmu potravy může mít negativní vliv na barvu (Hill, 1992).

Mezi nejčastěji studované pigmenty patří karotenoidy a melaniny, které se liší svým původem. Karotenoidy jsou pigmenty, které živočichové neumějí syntetizovat. Jejich exprese závisí na příjmu nutričně dostatečné potravy. Oproti tomu melaniny jsou syntetizovány z aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu (Fox 1976).

2.4.2.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou živočišná barviva rozpustná v tucích (Veselovský, 2001 a McGraw, 2006a). Karotenoidová pigmentace koreluje s mírou pohlavního dichromatismu (Gray 1996). Mezi karotenoidy patří karoteny, jejichž molekuly jsou tvořeny pouze uhlíkem a vodíkem. Dále sem patří xantofyly, které vznikají jejich oxidací. Vhodným příkladem je barvivo obsažené v peří plameňáků (*Phoenicopteridae*), xantaxtin. Plameňáci ho získávají z řas a drobných korýšů. Pokud se dostanou do zajetí, automaticky ztrácejí svojí typickou barvu. Proto se jim v zoologických zahradách do potravy přidává synteticky vyrobené

barvivo. Další příkladem je astaxantin. Tento sytě červený lipochrom se vyskytuje na hlavě samců bažantů (*Phasianinae*). Vzácné jsou také zelené karotenoidy, jakým je zooprasin (Veselovský, 2001), který se nachází ve svatebním šatu samců kajky mořské (*Somateria mollissima*). Karotenoidy přijímané z potravy mají vyšší signalizační schopnost než pigmenty na bázi melaninu. Zároveň ochraňují peří více než melanin před kvalitativní degradací kvůli bakteriím. Tento jev vede k vysvětlení, proč karotenoidy převládají v oblastech těla, které jsou využívány pro sexuální komunikaci nebo pro varování před nepřítelem pomocí barvy (Grande et al., 2004).

Proměnlivý obsah karotenoidů v peří je dán nízkou mírou dědičnosti a větší vazbou na prostředí. Evans a Sheldon (2015) zjistili, že význam dědičných faktorů přispívá k proměnlivosti karotenoidů. Zároveň naznačují, že množství karotenoidů usnadňuje evoluční odpověď a výběr. Unikátní schopností rozlišovat škálu ultrafialového, fialově modrého a žlutočerveného záření ptáci dokáží rozlišovat odrazivost karotenoidy zbarveného peří (Zscheile et al., 1942 ex. Evans and Sheldon, 2015).

Působení prostředí má tedy vliv na zbarvení jedince, ale nemá velký význam v natálním období vývoje za předpokladu, že v juvenilním stádiu má konkrétní druh ptáka jiné zbarvení než v dospělosti. V juvenilním období má vliv na rozdíly v obsahu karotenoidů pouze fialově modrá škála, zbylé dvě škály jsou závislé na ročním období a na prostředí, ve kterém se jedinec vyskytuje (Evans and Sheldon, 2015).

2.4.2.2 Melanin

Melanin je polymer, který absorbuje světlo. Můžeme ho nalézt jak v rostlinné, tak živočišné říši. U živočichů tvoří hlavní pigment, který je přítomný v povrchových buňkách obratlovců. V průběhu biogeneze oxiduje tyrozin enzymem tyrozinázou. Právě tento enzym je u obratlovců aktivní jen u pigmentového epitelu sítnice a melanocytů. Melaninové granule plné melanocytů jsou přenášeny do epitelových buněk, které tvoří u savců pigment vlasů a pokožky, u ptáků tvoří pigment peří (Riley et al., 1997), barvu očí, kůže a skořápek (Hill, 2006). Právě melanin patří k nejběžnějšímu a široce zastoupenému pigmentu v peří, vyskytujícímu se u naprosté většiny ptáků (McGraw, 2006, Stoddard and Prum, 2015).

Kromě absorpce světla má melanin i další funkce. Další rolí je regulace, maskování nebo fotoprotekce (Riley et al., 1997). Množství melaninu v těle jedince závisí na mnoha faktorech, zejména na rozdílném areálu výskytu, typu potravy nebo struktuře peří (Roulin 2007).

Ptáci jsou barevně nejpestřejší skupinou obratlovců (Prota, 1992). Melaninové pigmenty vytvářejí širokou škálu barev prostřednictvím absorpce světla v celém viditelném spektru a jsou přítomny ve veškerém peří ptáků (Stoddard a Prum 2011).

Melanin podle stupně oxidace existuje ve dvou variantách a to v podobě černého eumelaninu a načervenalého feomelaninu (Prota, 1992, Veselovský, 2001). Průměrné množství eumelaninu a feomelaninu je upraveno především MC1R¹. Vazba melaninu, která stimuluje hormon MSH² na MC1R, aktivuje produkci intracelulárních cAMP³. To vyvolává transkripční faktor MITF⁴ a zvyšuje aktivitu enzymů eumelaninu. Vazba z inverzivních agonistů a antagonistů z melanokortikoidů (ASIP⁵) způsobuje snížení eumelaninu a zvyšuje se množství enzymů feomelaninu (Roulin 2013a).

Roulin (2007) konstatuje, že stupeň přítomnosti melaninu je u ptáků silně dědičný a značí stupeň kvality jednotlivce. Zároveň předkládá teorii, v níž množství feomelaninu není spojeno s námluvným chováním ani s velikostí, hmotností nebo mazovou žlázou jedince. Zdůrazňuje, že samci s většími nebo s více tmavými pruhy jsou zvýhodnění v období námluv.

V peří ptáků se neobjevuje melanin jen celistvě, ale i ve formě tmavých pruhů. Jedná se o takzvaný shluk melaninu. Tyto body jsou u každého ptáka individuální a celkově vytváří proužky. Jejich hlavní funkcí je posílení peří principem zmírnění možnosti ohybu jednotlivých typů per. Častěji lze pozorovat větší koncentraci u samic. Samice ptáků jsou větší, a tím pádem těžší než samci, mají tak vyšší frekvenci v mávání křídel a tedy větší nároky na kvalitu per (Roulin, 2013b).

¹ melanokortinový-1 receptor

² melanocyty stimulující hormon

³ cyklický adenosinmonofosfát

⁴ transkripční faktor

⁵ agouti-signaling-protein

Peří obsahující velké množství melaninu je tužší a vyžaduje menší péči než stejné peří s menším obsahem melaninu (Roulin 2007, 2013a, 2013b). Roulin zároveň shledal, že pokud se jedná o ptáka tmavšího typu, jeho peří je více odolné proti odření. Další výhodou tmavšího peří je lepší ochrana před napadením parazitů.

D'Alba et al. (2014) zjistili, že ptáci, kteří jsou dominantní, mají jasnější skvrny. To podle nich svědčí o konzistentním zdraví. Ukládání a produkce melaninu je energeticky poměrně nákladná, takže v případě, že je pták ve stresové situaci nebo jinak strádá, sníží se jeho množství. Pokud jsou ptáci méně citliví na stres, mají větší černé skvrny než jedinci s vyšší citlivostí (Almasi et al., 2008). Zajímavé je, že se tyto znaky přenášejí i z matky na mláďata. Pokud je matka tmavší, její mláďata mají symetričtější peří na levé i pravé straně křídel (Roulin et al., 2003). V případech častějších stresových situací jsou vyplavovány glukokortikoidy, které ovlivňují syntézu melaninu (Roulin et al., 2010).

2.4.2.3 Porfyriny

Porfyriny jsou dalším barvivem vyskytujícím se v peří ptáků. Chemicky jsou příbuzné hemoglobinu a žlučovým barvivům. V ultrafialovém záření má toto barvivo sytě červenou barvu, proto se u živočichů projevuje jako zbarvení hnědé až rezavé. (McGraw, 2006b). Porfyriny se ukládají do rostoucích per, kde nejsou přímo vystaveny slunečnímu záření, pokud se vyskytují na světle, stávají se nestabilní a rychle vyblednou (Weidensaul et al., 2011). Podle Dycka (1992) patří mezi nejznámější porfytiny červený turacin nebo zelený turakoverdin. Atomy železa jsou v něm nahrazeny mědí. Tento sytě zelený porfyrin se vyskytuje v perech například u afrických turaků (*Musophagidae*) nebo u hrabavých (*Galliformes*). Tyto pigmenty se vyskytují hojně také u sov (*Strigidae*) a dropů (*Otididae*) (Gray 1996).

2.4.2.4 Další zbarvení

Do této skupiny patří strukturální zbarvení, které rozdělujeme do dvou skupin. Může být iredescentní (duhové), kdy se mění barva pera v závislosti na úhlu pozorování, nebo neiridescentní (prosté strukturální), které zůstává stejné nezávisle na geometrickém úhlu

a tvoří hlavně fialové, modré, tyrkysové a ultrafialové zbarvení (Prum et al. 1999). MacGraw (et al., 2002) konstatuje, že strukturální zbarvení je indikátorem zdraví a kondice jedince.

Modrá barva jako taková u ptáků neexistuje. Je závislá na lomu světla v zakaleném prostředí⁶. Modrý odstín, který známe například z peří křídel sojky obecné (*Garrulus glandarius*), je vytvořen rozšířenými větvemi (*rami*), kterým chybějí paprsky (*radii*). Tyto větve mají uvnitř červenou podložku melaninu, který absorbuje paprsky s největší vlnovou délkou. Kolem melaninové vrstvy jsou vzduchové komůrky. Pero s těmito vlastnostmi má nejkratší vlnovou délku ze spektra člověku viditelných barev. Tím dochází k efektu, že barva s nejmenší vlnovou délkou překrývá ostatní barvy a dělá celkový dojem modré. Zde funguje stejný princip, jako je tomu při pozorování oblohy, která se lidskému oku jeví jako modrá. U volně žijících zelených andulek vlnkovaných (*Melopsittacus undulatus*) se ve stěnách vzduchových komůrek vyskytuje rozptýlené žluté barvivo. Toto barvivo způsobuje, že výslednou barvu peří člověk vnímá jako zelenou (Veselovský, 2001).

Dalším specifickým zbarvením je albinismus. Pravý albinismus je charakterizován úplnou ztrátou pigmentů (Sage, 1962, Veselovský, 2001). Pera mají bílou barvu, stejně jako oči nebo kůže, které se jeví načervenalé díky prosvítající krvi ve vlasečnicích (Sage, 1962). Je to pravděpodobně nejčastější mutace barev. Pokud má pták bílé peří, ale v očích a kůži je pigment zachován, jedná se o leucismus. U některých druhů ptáků, například u vrabců, se může vyskytovat albinismus částečný, v takovém případě jsou bílá jen některá pera. Úplným opakem albinismu je hyperchroismus, při kterém dochází k velkému zmnožení barviva a peří dostane sytě černou barvu (Veselovský, 2001).

Důkladné zkoumání pohlavního dimorfismu sovy pálené (*Tyto alba*), jemuž se v posledních letech věnuje především Roulin (2007, 2010, 2013a, 2013b), poskytuje vhodný základ i k definici znaků kalouse ušatého. Ve své studii se věnuje např. znatelně vyššímu výskytu melaninu u samic a tedy tmavšího zbarvení.

⁶ Tyndallův jev je rozptyl světla, při průchodu kalným prostředím (Kvítek a Panáček, 2007).

3.5.2.5 Spektrální analýza barvy

Díky rozvoji digitálních technologií se v posledních letech ve výzkumech živočišné říše s úspěchem využívá obrazových informací. V současné době se pro umožnění záznamu obrazu používají dvě technologie - CMOS⁷ a CCD⁸. Obě se shodují v procesu záznamu obrazu, který se skládá ze šesti složek. Nejprve se vytvoří a přenesení obraz pomocí čoček, zrcadel a svazků optických vláken (Zmeškal a kol., 2002).

Druhým důležitým krokem je separace barevných složek pomocí vhodných optických filtrů RGB. Je to aditivní způsob míchání barev. Systém funguje jako trojdimenzionální barvový prostor, jehož komponentami jsou červená (R), zelená (G) a modrá (B). Mícháním těchto barev může vzniknout kterákoliv barva (Sonmez et al., 2004). Tyto barvy v oblasti lidského vidění odpovídají barevným citlivostem čípků sítnice lidského oka při trichromatickém vidění (Jacobs and Nathans, 2010).

Model RGB lze zobrazit jako krychli, ve které každá kolmá hrana udává škálu mohutnosti barevné složky. Pokud se tato mohutnost zvětšuje, automaticky dochází k zesvětlení barvy. Proto další barvy, které se dají vyjádřit, jsou bílá (W) a černá (B). Bílá barva je v rámci RGB označena třemi nejvyššími možnými číslicemi 255, 255, 255. Oproti tomu černá barva je vyznačena 0, 0, 0. Barva R je zastoupena jako 255, 0, 0, G jako 0, 255, 0 a barva B jako 0, 0, 255 (Sonmez et al., 2004).

Z RGB lze vyvodit další barvový prostor CMY, tedy azurový (C), ten se v číselném zobrazení projevuje jako 0, 255, 255. Dále purpurový (M) číslicemi 255, 0, 255 a žlutý (Y) číslicemi 255, 255, 0 (Sonmez et al., 2004).

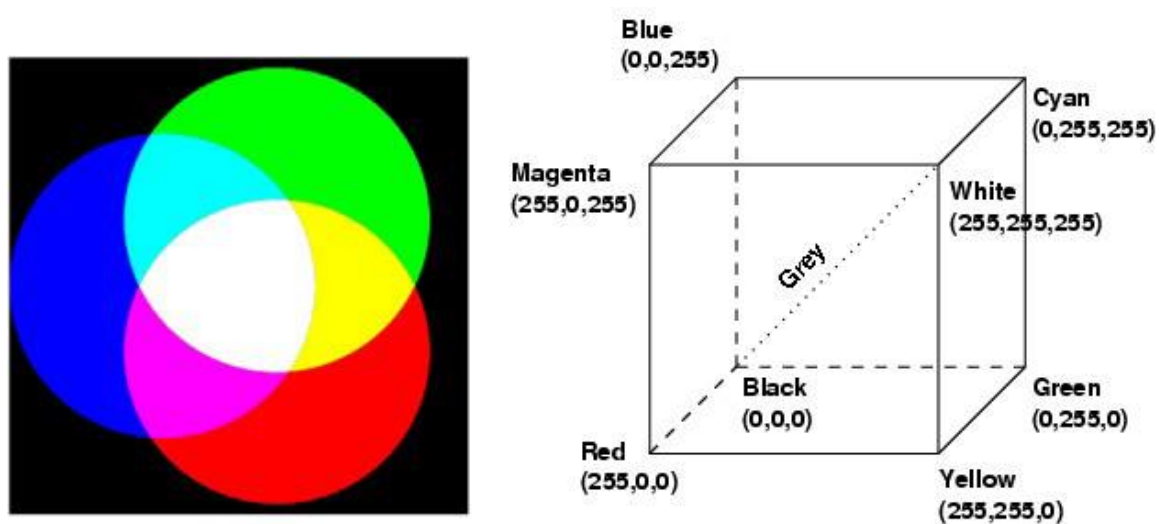
⁷ Complementary Metal Oxide Semiconductors

⁸ Charge Coupled Devices

barva	R	G	B
bílá	255	255	255
černá	0	0	0
červená	255	0	0
zelená	0	255	0
modrá	0	0	255
azurová	0	255	255
purpurová	255	0	255
žlutá	255	255	0

Tabulka 1: Znázornění RGB hodnot u jednotlivých barev.

Celek tvoří barevný prostor, na němž je založen téměř každý elektrotechnický zobrazovací systém. (Zmeškal a kol., 2002).



Obr. 3 (a) Míchání základních barev v RGB modelu. (Chaves-Gonzalez, Vega-Rodriguez et al. 2010), (b) RGB model znázorněn jednotkovou krychlí v Kartézské soustavě souřadnic.

2.5 Tetrachromatismus

Jednotlivé signály barev se liší v závislosti na schopnostech zraku. Lidské oko má barevné vidění založeno na třech typech pigmentů absorbující světlo. Tato vlastnost vidění se nazývá trichromazie (Goldsmith 1990, Jacobs and Nathans, 2010) a je dána stavbou sítnice, kde se vyskytují tři druhy čípků s absorpčním maximem okolo 560, 530 a 430 nm (Goldsmith 1990). U zbytku savců je vidění jen dichromatické. Barevné vidění je tak založeno na dvou typech zrakových pigmentů. U ptáků se vyskytuje tetrachromatismus, jsou vybaveni čtyřmi typy čípků. Z tohoto důvodu dokážou i vnímat ultrafialové světlo, které je lidskému oku neviditelné (Jacobs and Nathans, 2010).

U ptáků jsou v každém čípku obsaženy olejové kapénky. Olejové kapénky, které mají vysokou koncentraci karotenoidů, jsou rozmístěny takovým způsobem, aby přes ně procházelo světlo dřív, než dojde k membráně vnějších čípků, na které jsou umístěny zrakové pigmenty. Hlavní funkcí kapének je filtrování krátkých vlnových délek a zužování absorpčního spektra zrakových pigmentů. Tato funkce zvyšuje počet barev, který jsou ptáci schopni vnímat (Goldsmith, 2008).

Schopnost vidět ultrafialovou barvu ptáci využívají při sběru potravy (Goldsmith (2008). Plody, semena, květy nebo bezobratlí živočichové odrážejí oproti neživému prostředí UV světlo. Dalším důvodem k rozvoji schopnosti rozpoznávání UV záření je signalizace v mezipohlavních interakcích nebo v interakcích v rámci jednoho pohlaví (Bennett and Cuthill, 1994). Oba dva vztahy jsou patrné například u sýkory modřinky (*Parus caeruleus*). Odrazivost UV záření má význam v mezipohlavním výběru sýkor (Sheldon et al., 1999). UV signály v interakci mezi stejným pohlavím jsou také významné, protože ovlivňují výsledek agresivity samců, například pokud brání hnízdo, nebo je v období získávání vhodného území pro reprodukční úspěch (Alonso-Alvarez et al., 2004).

2.6 Odchyt

Metody praktického výzkumu ptáků lze v zásadě rozlišit na „bez odchytu“ a „s odchyt“ . Obě techniky vyžadují podřízení se obecným zásadám o ochraně přírody. U techniky s odchyt je třeba navíc respektovat zákon č. 246/1992 Sb., který reguluje manipulaci s ptáky. Jedná se především o manipulaci, která ptákům může způsobit bolest, popřípadě kdy jsou ohroženi na přirozeném způsobu života (Stejskal, Vermouzek, 2004). Odchyt je nutné provádět v souladu s několika stanovenými postupy podle druhu ptáka, o který se jedná (Whitworth et al., 2007).

2.6.1 Historie odchytu

Již od pravěku patří chytání ptáků k běžným součástem lovu, který se používal na celém světě. V tomto období byli ptáci ochytáváni především kvůli potravě (Bub, 1991, Whitworth et al., 2007), ale také se ptačí peří využívalo k výrobě oblečení nebo k projevům náboženské kultury (Whitworth et al., 2007). Ve středověku se odchyt začal zdokonalovat díky sokolnictví a vyvíjel až do současnosti, kdy je právě metoda s odchyt jedním ze základních stavebních kamenů výzkumu ptáků (Bub, 1991).

Již od pravěku byli lidé vynalézaví a k odchytu používali řadu technik. Na přelomu 19. a 20. století (i díky rozvoji letectví) se z výzkumných důvodů chytání dostalo různých pravidel, která v roce 1925 na kongresu v New Yorku prezentoval Lincoln v článku „Bird Banding – in Progress and Prospect“, publikovaném později v *The Auk* v roce 1926. Právě tento text se stal základem o pravidlech odchytu ptáků a rozvoji výzkumné metodiky odchytu ptactva (Bub, 1991).

2.6.2 Odchyt do nárazových sítí

Tento typ odchytu je velmi často používaná metoda pro odchyt malých až středně velkých druhů ptáků. Z obrázku 4 je patrné, že právě tato metoda je využívána již dlouhou dobu. První jednoduchá podoba nárazových sítí se skládala ze soustavy nástrah, které byly

vystaveny blízko sebe tak, aby vytvořily takřka plot. Tato forma nástrah se využívala k odchytu lovných druhů hrabavých ptáků. Během let se tento způsob postupně zdokonaloval a v 19. století byl v Japonsku vynalezen typ nárazových sítí (Bub, 1991).

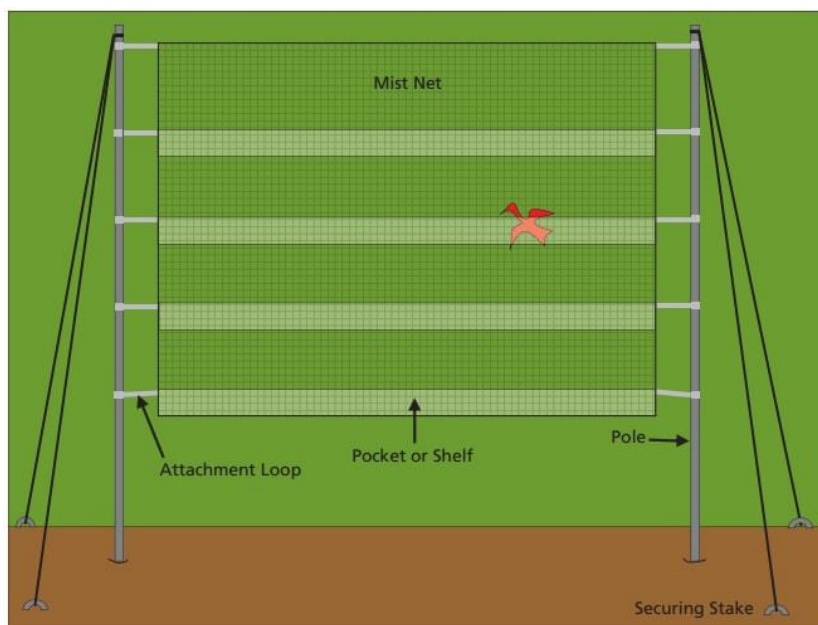


Obr. 4: Počátky odchytu ptáků do sítí. Podle: Bub, 1991

Koncem 60. let 20. století vznikla v Československu nová metoda odchytu sov a dravců do sítí. Předtím se tito ptáci chytali pouze do sklopek na návnadu, kterou nejčastěji představoval zvonek zelený chráněný v kleci, který byl odolný a k tomuto účelu vhodný. Dnes už tato metoda není dovolená. V našich podmínkách byly sítě pleteny hlavně kroužkovateli, protože z finančních důvodů nebylo možné sítě zakoupit. Sítě byly instalovány do předpokládaného průletu sov, většinou na pole kolmo na křoviny. Jako návnada byli používáni živí ptáci (pěvci) v klecích vedle sítě. K přilákání kalousů sloužilo takzvané myškování - napodobování hlasů soupeřících hrabošů. Sítě byly instalovány tak, aby počátek odchytu začal po západu slunce, kdy kalousové odlétají za potravou. Místo odchytu bylo vzdáleno zpravidla do 200m od místa denního odpočinku, tak aby „myškování“ kalouse přilákalo (Řezníček, ústní sdělení).

Jednoduchým principem nárazové sítě je natažení jemné tkaniny s příslušně rozměrnými oky mezi dvě dostatečně vysoké tyče (Bub, 1991, Whitworth et al., 2007). Velikost ok sítě

závisí na odchytávaném druhu. Menší oka se používají například pro pěvce a větší na sovy (Whitworth et al., 2007). Nejpoužívanější barvou jsou černé sítě, protože černá barva nejvíce absorbuje sluneční paprsky. Dalším důvodem je, že je ve vzduchu nejméně viditelná proti různému pozadí (Bub, 1991). Pokud se síť správně nastaví, jejich drobná oka jsou velmi těžce rozpoznatelná i pro ptáky, kteří mají velmi dobrý zrak. Většina nárazových sítí má tři nebo čtyři řady s „kapsami“ (na obrázku jako „pocket or shelf“). Úlohou těchto kapes je především chránit ptáka, aby se po náletu do sítě neporanil (Bub, 1991, Whitworth et al., 2007).



Obr. 5: Grafické znázornění nárazové sítě. Podle: Whitworth et al. 2007

V současnosti je již téměř nezbytné využívání systému audio nahrávek, které napomáhají přilákat vybraný druh ptáka a výrazně tak zkracují dobu čekání na daného jedince.

2.6.3 Kroužkování

Jedním ze základních předpokladů k vědeckému pozorování a hlavním důvodem systematického odchytu je kroužkování jedinců. Tento typ výzkumu patří v dnešní době k nejrozšířenějším proto, že relativně jednoduchým postupem vnáší vědecké poznatky do oblasti biologie ptáků, díky nimž se sestavují postupy k praktické ochraně přírody. Ptáci zároveň slouží jako velmi relevantní bioindikátory stavu životního prostředí (Stejskal, Vermouzek, 2004).

Na konci 19. století byla modernímu kroužkování udělena pravidla, která jsou platná dodnes, s využitím kroužků se zpáteční adresou a sériovým číslem. Profesor Hans Christian Cornelius Mortensen byl prvním, kdo kroužkování zahájil. Nejprve označil dva špačky obecné (*Sturnus vulgaris*) zinkovými kroužky. Později začal používat hliníkové kroužky. Od roku 1899 kroužkoval ptáky ve velkém měřítku. Během svého života okroužkoval okolo 5000 ptáků v 33 druzích. V zahraničí se jeho metoda poprvé ujala ve stanici Vogelwarte Rossitten v Německu (Cepák, 2008).

Tato stanice byla v odchytu a kroužkování velmi úspěšná a postupně ji následovaly další kroužkovací centrály v jiných zemích. Mezi první státy patřilo v roce 1908 Maďarsko nebo v roce 1910 Velká Británie (Cepák, 2008).

Metoda kroužkování na území dnešní České republiky a Slovenska má velmi staré kořeny. V někdejší Rakousko – Uherské monarchii byla již v roce 1910 zřízena první ornitologická stanice - v Liběchově u Mělníka. Tato stanice vznikla především díky zásluze Ing. Kurta Loose a dr. K. Richtera. Právě Loose byl prvním kroužkovatelem na našem území a zpočátku byli ptáci označováni maďarskými kroužky. V roce 1914 kroužkovatelé v Liběchově začali používat kroužky s označením „Lotos“. Tento název byl odvozen od přírodovědného spolku zabývající se přírodou Čech. Od roku 1934 se kroužkovací stanice rozvíjela v rámci Československé ornitologické společnosti, která spolupracovala s přírodovědným oddělením Národního muzea v Praze. Všechny kroužky tak měly a dodnes mají nápis „N. MUSEUM PRAHA“. Zapálení českoslovenští ornitologové byli nejaktivnější ve výzkumu drozda zpěvného (*Turdus philomelos*), racka chechtavého (*Larus ridibundus*), špačka obecného (*Sturnus vulgaris*) a především kachny divoké (*Anas*

platyrhynchos), u nichž dosáhli mnoha pozoruhodných, zlomových výsledků. O rozšiřování metody kroužkování ptáků se u nás zasloužili mimo mnoha jiných především dr. Josef Jirsík nebo Ing. Otta Kadlec (Cepák 2008, www.nm.cz).

Jak lze předpokládat, k odchytu ptáků nepostačuje zapálení a síťka na motýly, na tuto aktivitu je nutné absolvovat vzdělávací program a úspěšně složit zkoušky odborné způsobilosti, kterou vyžaduje zákon č. 246/1992 Sb. (Stejskal, Vermouzek, 2004).

V rámci získávání dat pro posuzování barev kalouse ušatého se provádí odchyty s kroužkováním. Někteří odchycení kalousové jsou zpětně hlášeni v podobě výše níže zprávy (obr. 6).



Národní muzeum
Kroužkovací stanice
Hornoměřcholupská 34
102 00 Praha 10

Hlášení kroužkovaného ptáka

Data kroužkování		Data nálezu	
Kroužek	PRAHA D 188830	Datum	24.10.2014
Druh	ASIO OTUS	Místo	Kladno
	Kalous ušatý	Okres	Kladno / CZ17
Pohlaví	neurčeno	Stát	Czech Republic
Věk	1. rok	Upřesnění	
Datum	2.8.2014	Souřadnice	50°08' N 14°05' E
Místo	Kladno	Druh	ASIO OTUS
Okres	Kladno / CZ17		Kalous ušatý
Stát:	Czech Republic	Pohlaví	neurčeno
Upřesnění		Věk	+1. rok
Souřadnice	50°08' N 14°05' E	Kondice	živý (kontrolován kroužkovatelem, volný) (8)
Poznámka	mládě dokrmeno a vypuštěno	Okolnosti	chycen (20)
Kroužkovatel	Starý Petr (2001)	Poznámka	
		Nálezce	Řezníček Jan (283)

Vzdálenost (km) 0
Uplynulý čas (dny) 83
Směr 0,00
Ref: 25.11.2014/A63226

Obr. 6: Hlášení kroužkovací stanice o kroužkovaném ptáku.

2.7 Záchranné stanice se zdokumentovaným záznamem výskytu kalouse ušatého

2.7.1 ORNIS

ORNIS je název ornitologické stanice, která spadá pod muzeum Komenského v Přerově. Přírodovědné oddělení přerovského muzea se zabývá zejména ornitologií už do roku 1932, kdy zde byla zbudována první moravská ornitologická stanice (www.ornis.cz).

V muzeu jsou k vidění stálé expozice téměř 400 druhů volně žijících ptáků, jejichž výskyt byl zaznamenán na českém území. V sezonních výstavách navíc muzeum důkladně představuje život určitých druhů ptáků. Současně je muzeum i vědeckým pracovištěm, kde se odborní pracovníci zabývají výzkumem v oblasti parazitologie ptáků, tahem vodních druhů ptáků a hnízdní ekologií. Dále je zde v rámci instituce zřízena záchranná stanice pro zraněné živočichy z volné přírody (www.ornis.cz).

Kalouši, kteří byli použiti do této studie, byli součástí výzkumu parazitologických pitev a následně použiti na balky⁹ (Chytil, ústní sdělení).

2.7.2 Záchranná stanice hl. m. Prahy pro volně žijící živočichy

Záchranná stanice v Praze vznikla pod svazem ochránců přírody v roce 1983. Původně tato stanice vznikla jako útulek pro trvale handicapované živočichy. Přibližně po půldruhém roce existence začala stanice přijímat i zraněné jedince. Postupem času se stanice rozrůstala a v roce 2003 tu bylo umístěno přes dva tisíce živočichů. Toto číslo roste pravděpodobně i proto, že většina živočichů je lidmi do místa donášena nepotřebně, jako například zdánlivě opuštěná mláďata ptáků i savců nebo ježci v podzimním období (Příbylová, ústní sdělení).

Od roku 2011, kdy stanici převzaly do správy Lesy hlavního města Prahy, je instituce záchrannou stanicí pro zraněné a volně žijící živočichy. V současnosti se ve stanici nachází

⁹ Stažené kožky obratlovců s peřím, popřípadě srstí, které jsou vyplněny pilinami nebo vatou a jsou vysušené (Altman, 1972).

zázemí pro intenzivní péči o zraněné živočichy a mláďata a další zázemí důležitá pro chod stanice (www.lhmp.cz). Pro svůj trvalý handicap se zde nachází několik druhů zvířat, jako je luňák hnědý (*Milvus migrans*), orlovec říční (*Pandion haliaetus*) nebo krkavci (*Corvus corax*) (Příbylová, ústní sdělení).

Pro dokumentaci byli použiti kalousi právě z této záchranné stanice.

2.7.3 Ptáci v zajetí

Kontrola stavu peří po odchytu je základním předpokladem k posouzení celkové kondice ptáka. Na kvalitě zbarvení peří se dá usoudit, zda byl jedinec v poslední době stresován a žil například v prostředí záchrané stanice. Jak je popsáno v kapitole 2.4.2.1 Karotenoidy, barva peří je obrazem fyziologických procesů v životě jedince, které ovlivňují tvorbu a obsah karotenoidů v jednotlivých perech během přepeření. Ukazuje se, že zvířata, která se vyskytují v zajetí, mají světlejší zbarvení (Hill, 1992). Burley et al. (1992) toto tvrzení demonstrují na příkladu zebříček pestrých (*Taeniopygia guttata*), které byly pro účely jejich studie chované v těsném prostředí. Stresující podmínky způsobily, že zebříčky měly zřetelně méně sytou charakteristickou barevnou skvrnu pod okem i obvyklou červenou barvu zobáku, přestože byly nutričně dostatečně saturovány.

Ptáci, kteří se nacházejí v zajetí, v klecích nebo voliérách, se dají snadno rozpoznat především podle opotřebovaných špiček letek. Peří je na koncích viditelně poškozené od mříží klece, v níž je pták umístěn. U jedinců držených v zajetí se často vyskytují i další drobné oděrky (Řezníček, ústní sdělení).



Obr. 7: Detail hlavy kalouse ušatého v zajetí. Foto: Hlasivcová



Obr. 8: Detail špičky letek kalouse ušatého v zajetí. Foto: Hlasivcová

2.8 Kalousi na letišti

Kalousi do této studie byli získáni také odchycem na letišti Václava Havla v Praze, kde jsou k odhánění různých druhů ptáků z dosahu startujících a přistávajících letadel využíváni trénovaní dravci, např. jestřábi (*Astur*) nebo i psi, např. kolie (*Canis lupus familiaris*) (Harris and Davis, 1998). Výskyt ptáků v okolí letišť je významně nežádoucí, neboť ptáci mohou způsobit poškození letadla a ohrožovat tak životy lidí (Byron and Downs, 2002). V roce 1975 došlo na Kennedyho letišti v New Yorku k jedné z nejzávažnějších nehod kvůli opeřenci, kdy byl racek mořský (*Larus marinus*) vtáhnut do jednoho z motorů. Tehdejší škoda se vyšplhala k 24 milionům amerických dolarů, naštěstí v tomto případě nebyly žádné ztráty na životech. Proto dochází k rozvoji postupů, jimiž lze zajistit, aby letištní plocha a její nejbližší okolí nebyla pro ptáky atraktivní (Solman, 1976).

2.9 Určování pohlaví pomocí DNA

Pohlaví gonochoristických organismů bývá určeno vzájemnou kombinací gonozomů. Existují různé typy určení pohlaví. U ptáků, motýlů a některých druhů ryb pohlavní chromozomy označujeme Z a W (Stevens, 1997). Samice mají soustavu alel ZW a jsou tak heterogametické. Naopak samci jsou homogametičtí, jejich chromozomová sada je ZZ. Na základě prokázání přítomnosti nebo naopak absence W chromozomu lze určit pohlaví zkoumaného jedince (Grifiths et al., 1998, Itoh et al., 2001).

2.9.1 PCR

Zkratka PCR pochází z anglického názvu Polymerase Chain Reaction. V češtině je tato metoda známá jako polymerázová řetězová reakce, jejíž princip je založen na využití DNA polymerázy pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. Syntéza je řízena krátkými primery, které nasedají na templátovou DNA na začátku a na konci amplifikovaného fragmentu. Metoda je velmi citlivá, umožňuje detekci každé jednotlivé buňky a in vitro amplifikaci úseku DNA (Zima a kol., 2004), takže původní množství DNA může být pro analýzu i velmi malé (Itoh et al., 2001, Zima a kol., 2004). Díky tomu, že syntetizovaná DNA obsahuje jen výhradně studovanou sekvenci, není nutné ji dále purifikovat (Zima a kol., 2004).

2.9.1.1 Historie metody PCR

Kleppe et al. (1971) jako první uveřejnili práci o PCR, která popisovala její hlavní principy, avšak za objevitele této metody je považován Dr. Kary Banks Mullis. První publikace o nové metodě PCR, kterou publikoval, se dostavila v roce 1985 v časopise Science (Saiki et al., 1985). V té době pracoval ve společnosti Cetus Corp, která mu poskytla možnost plně se věnovat výzkumu PCR. Postupně techniku PCR zdokonaloval, publikoval o ní dva podrobné články (Mullis et al., 1986, Mullis and Faloona, 1987), a následně si tuto metodu v roce 1987 nechal patentovat. V roce 1993 obdržel Nobelovu cenu za chemii pro objev PCR metody (www.karymullis.com).

2.9.1.2 Princip a průběh reakce

Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, které jsou nositeli genetické informace a základními hybateli všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklické opakování enzymové syntézy nových řetězců vybraných úseků dvouřetězové DNA ve směru 5' 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Aby došlo k oddělení dvou řetězců templátu, je DNA zahřáta a jsou přidány dva primery, které jsou komplementární ke koncovým sekvencím oblasti, která má být amplifikována. Při ochlazení na vhodnou teplotu dané primery nasednou na komplementární úseky templátu a je přidána termostabilní DNA polymeráza a směs deoxynukleotidů (dATP , dCTP, dGTP, dTTP). Tyto deoxynukleotidy slouží jako stavební kameny pro syntézu nových řetězců DNA podle templátu (Králová a kol., 2001).

V průběhu metody dochází ke kopírování sekvence templátu v několika po sobě jdoucích cyklech s tím, že se v každém cyklu počet kopií zdvojnásobí, protože fragmenty, které byly nasyntetizovány v předchozích cyklech, slouží jako matrice v následujících cyklech a množství DNA roste (Zima a kol., 2004).

Jeden cyklus se skládá ze tří kroků:

- Denaturace templátu (Denaturation) – je první fází. Při něm dochází k zahřátí dvouřetězové DNA na teplotu 92-95°C a díky vysoké teplotě dojde k denaturaci. Pomocí tohoto zahřátí dojde k rozvolnění DNA a vznikají jednotlivé řetězce (Zima a kol., 2004). Pro správný průběh procesu je důležité, aby došlo ke kompletnímu oddělení obou vláken. Pokud by se tak nestalo, mohlo by dojít k rychlé renaturaci celé molekuly a zabránění interakce s primery (Králová a kol., 2001).
- Připojení primerů (Annealing) – Jedná se o další a nejdůležitější krok procesu, protože na tom, jestli se primery správně navážou, závisí celá PCR. Reakční směs je ochlazená. Teplota se liší individuálně podle délky primeru a jeho dalších vlastností, avšak nejčastěji se pohybuje mezi 45-60 °C (Králová a kol., 2001, Zima a kol., 2004).
- Syntéza vlákna DNA (Elongation) – je následující a zároveň poslední fází procesu. V této části dochází k syntéze nových řetězců, které navazují na 3' konce primerů. Syntézu nových vláken katalyzuje termostabilní DNA polymeráza. Tato polymeráza je označována jako Taq polymeráza. Její funkcí je prodlužovat vlákna DNA směrem od

obou primerů ve směru od 5' konce k 3' konci za teploty 72°C. Jednotlivé nukleotidy se postupně začleňují do řetězce rychlostí okolo 35 navázaných nukleotidů za sekundu (Králová a kol., 2001, Zima a kol., 2004).

Jednotlivé kroky se cyklicky opakují 20-40krát (Zima a kol., 2004).

3 Metodika

3.1 Metody získávání dat

Kalous ušatý (*Asio otus*) je druhou nejhojnější sovou na území České republiky (Šťastný, 1996, 2006). Exempláře sov pro účely této výzkumné studie k determinaci pohlaví byly získány z různých zdrojů, materiál však pocházel pouze z území České republiky. Šlo o získání materiálů ze živých jedinců při odchytu a kroužkování. Dalším zdrojem bylo ornitologické muzeum v Přerově a záchrané stanice v Praze. Vzorky kalousů byly získány i z odchytu na pražském letišti Václava Havla.

3.1.1 Odchyt

Hlavním způsobem pro získání výzkumného materiálu pro účely této práce byl odchyt ptáků do nárazových sítí. Při této technice byly použity sítě Ecotone o celkové velikosti 3,5x12 m s oky o velikosti 40 mm. Sítě byly rozestaveny ve své blízkosti v jedné lokalitě. Dále byla na toto stanoviště postavena sklopka. Pro umocnění pravděpodobnosti úspěšného odchytu byla připravena nahrávka varovného hlasu kosa černého (*Turdus merula*) nebo zvuk pískání (myškování) hraboše polního (*Microtus arvalis*) podle prostředí, v němž k odchytu docházelo. Kromě toho byla použita i vycpanina výra velkého (*Bubo bubo*). Po instalaci všech potřebných prvků se vyčkalo na vhodnou dobu, tedy na stmívání, kdy jsou sovy v hledání potravy nejaktivnější a zapnutím nahrávky dotvořily ideální kulisy odpovídající prostředí odchytu. Bez zřejmého důvodu se v některých dnech chytání kalousů vůbec nedařilo, jindy naopak nalétávali do sítí ve velmi krátkých časových periodách a bylo velmi náročné kalouse včas vyprostit před přiletem dalšího. Každý chycený jedinec byl vyjmut ze sítě a okroužkován. Naprostá většina odchycených jedinců ještě nikdy chycena nebyla, v sítích však uvízlo i několik retrapů, tedy ptáků, kteří už kroužek měli. Díky jednotnému mezinárodnímu systému kroužkování lze jednoduše sledovat migraci ptáků. Na každém kroužku je vyznačen jeho původ, tedy stát a adresa kroužkovací centrály.

V terénu nejsou vždy příznivé podmínky pro posouzení zkoumaných znaků ptáka, proto byly každému exempláři snímány zkoumané partie a tato fotodokumentace byla důkladně analyzována později. Jednalo se o snímek hlavy, vnější a spodní strany křídla, křídélka, sekundární letky a ocas.



Obr. 9: Odchyt kalouse ušatého do nárazové sítě. Foto: Hlasivcová



Obr. 10 : Odchyt kalouse ušatého do nárazové sítě. Foto: Hlasivcová

3.2 Biometrické měření

U různých druhů ptáků se provádí biometrika délky těla, délky ocasu, rozpětí křídel, délky letek, délky zobáku, délky ocasu a délky pařátu Winker (1998). V případě biometricky kalouse ušatého jsou pro určení pohlaví významné hlavně délky letek. Při dřívějších měřeních bylo zjištěno, že délka těla, pařátu a ocasu nebyly pro určení druhu relevantní (Řezníček, 1991). Při měření v této studii kromě biometrického měření, tedy zjišťování délky jednotlivých částí těla, bylo prováděno posuzování barvy některých částí těla, které vedly k hodnocení, zda jde o samce nebo o samici. Biometrické měření bylo prováděno na křídélku.

Měření délky křídla, popřípadě celého ptáka, se nejčastěji provádí přímo během odchytu. Před zahájením měření se křídlo roztáhne do strany a natáhne. Ve studii byl kontrolován stav čtvrté sekundární letky praporu, která byla následně snímána.

Dalším krokem je samotné měření křídla. Křídlo se vrátí do pozice rovnoběžně s osou těla. Zápěstí křídla se umístí na záložku pravítka a palcem ruky se křídlo pevně, avšak opatrně přitlačí k tělu sovy. Druhá ruka současně rovná letky ptáka na maximální délku pomocí vyhlazení bočního zakřivení a mírným postranním tlakem na tělo ptáka (<http://seen-net.eu/a>). Podle Řezníčka (1991) vycházíme z předpokladu, že samice kalouse ušatého je větší, proto má tedy délku křídla nad 29 cm. Naopak samec má délku křídla pod 28 cm. Z toho délka, u které dochází k překrývání pohlaví, je 28 cm a 29 cm (Hudec K. a kol., 1994).

V rámci měření křídla dochází také k měření křídélka. V této studii se jedná o zaznamenání počtu a velikosti šířky v bodech, kde se na křídélku vyskytují tmavé pruhy. Měří se tak šířka tmavých pruhů praporu, které vycházejí od ostnu (žluté číslování) a šířka světlé barvy vnějšího praporu (červené číslování).



Obr. 11: Křídélko.
 žlutě - vyznačena šířka
 tmavých pruhů vycházejících
 z ostnu
 červeně – šířka světlé barvy
 vnějšího praporu
 Foto: Hlasivcová

Dále se měří ocas, tělo je ve svislé poloze s ocasem směřujícím k zadní straně v pravém úhlu. V tomto případě se nepoužívá pravítko s dorazem, ale pravítko leží na ocasu a jeho zarážka je vtisknutá do zad ptáka. Opět je důležité, aby se pravítko dotýkalo celého rýdovacího pera, nejdelší z nich je pak změřeno (<http://seen-net.eu/b>).

Doplňkovým měřením pro určení pohlavního dimorfismu sov může být u některých druhů ptáků měření délky zobáku, který je možno měřit podle vnějších rozměrů nebo podle rozměrů na lebce. Podle Mlíkovského (2001) je rozdíl způsobený výhradně stavbou ramfotéky, která kostěný základ zobáku protahuje. Rozsah ramfotéky se mění s roční dobou i věkem ptáka, proto je její měření poměrně problematické (Clancey, 1948, Hantge and Schmidt-Koenig, 1958 ex. Mlíkovský, 2001).

3.3 Určování pohlaví kalouse ušatého podle rozdílů ve zbarvení

Jedná se o hlavní metodu, na kterou se soustředí tato práce. Jak je již výše zmíněno, pohlaví kalouse ušatého se v podstatě nedá na první pohled rozeznat, protože tito ptáci nemají žádné výrazné znaky pohlavního dimorfismu. Přesto se ale dají najít a určit malé charakteristické odchylky samce od samice. Za jeden ze základních rozdílů je považována sytost barvy. Samice, které mají větší množství melaninu a kortikoidů v těle, jsou povětšinou sytější zbarveny. Naopak samci inklinují spíše ke světlejším barvám, jak je vidět na obrázku 9 (Baker, 1993, Martínez et al., 2002). Podle Baker (1993) je dalším možným rozpoznávacím znakem fakt, že samci mají tenčí tmavé proužky než samice.



Obr. 12: Porovnání sytosti barvy. Vlevo – samice, vpravo – samec. Podle: Martínez et al., 2002

Určování barevnosti ptáka bylo prováděno v terénu i v laboratoři. V terénu šlo však o hrubý odhad, následně v laboratoři došlo k podrobné analýze. Porovnávané typy jednotlivých částí per byly nafoceny vždy stejným fotoaparátem Nikon D5100.

3.3.1 Spektrální analýza barvy

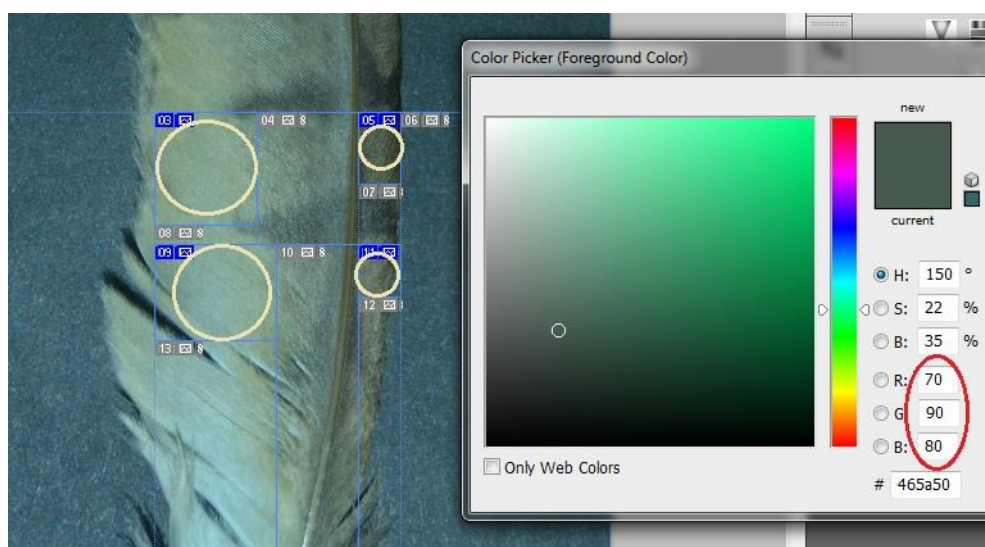
Ke zkoumání této části těla ptáka byla použita metoda spektrální analýzy barvy. Předpokladem přesného určení barvy u všech exemplářů bylo nezbytně nutné vytvoření homogenního prostředí. Z toho důvodu byla pro účely studie použita jednoduchá pomůcka - kartonová krabice, do které byly vyříznuty dva otvory. Jeden pro objektiv fotoaparátu

a druhý pro osvětlení pomocí svítilny GorillaTorch Flare FL2-01. Dno krabice bylo vyloženo standardní černou podložkou, na níž byly vyznačeny body, aby byla pera ve stejné poloze a na stejném místě. Zaznamené fotografie byly přeneseny a oříznuty v programu Adobe Photoshop CS5. Nejprve byl u všech per proveden výběr standardních bodů. Pomocí nástroje Ecliptical Marquee Tool z nich byla získána kroužky, ze kterých byla nástrojem Eyedropper Tool získána průměrná sytost jednotlivých měřených barev. Dále byly tyto sebrané hodnoty RGB vyhodnoceny v programu Microsoft Excel.

Tento postup byl zvolen u sekundární letky a u křídélka.

3.3.1.1 Spektrální analýza barvy u sekundární letky

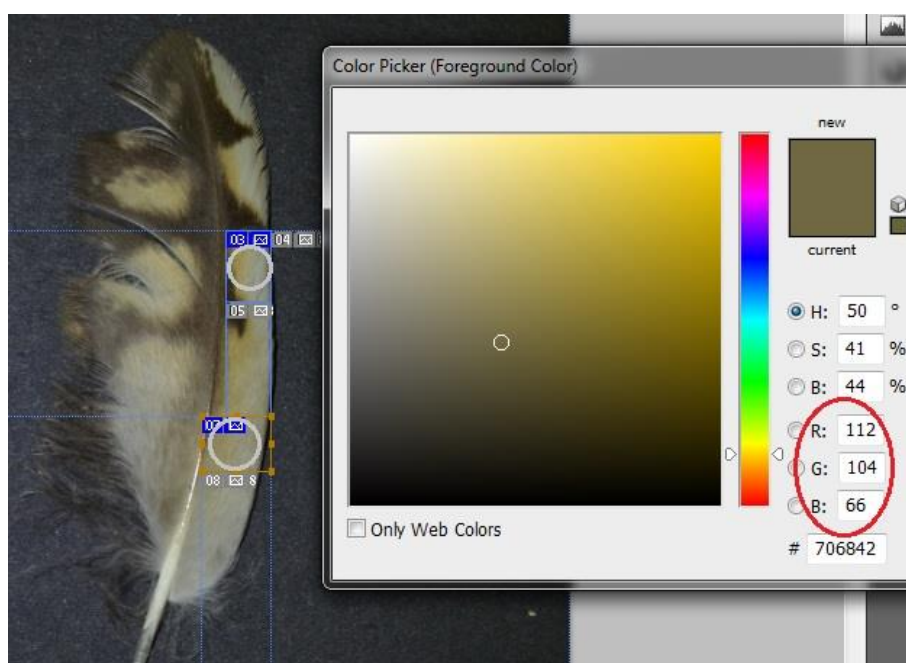
Během spektrální analýzy barvy byly zjištěny hodnoty průměrné sytosti. Barvy byly měřeny vždy dvě z vně a dvě vnitřně od ostnu pera. Aby mohly být analyzovány ve stejných bodech, byly vždy pro standardizaci měřeny pod čtvrtým a pod pátým tmavým pruhem vycházejícím z ostnu, viz obrázek 11.



Obr. 13: Analýza barev na sekundární letce v programu Photoshop.
 bílý kroužek - snímané části pera pro analýzu RGB
 červený kroužek - hodnoty RGB
 Foto: Hlasivcová

3.3.1.2 Spektrální analýza barvy u křídélka

Křídélko bylo kromě biometrického měření zkoumáno u všech vzorků ještě dalšími metodami. Byla na něm aplikována metoda spektrální analýzy barvy. Oproti měření na sekundární letce se změnil počet a rozmístění vyhodnocovaných bodů. V případě měření křídélka byly použity dva body, ze kterých se snímaly hodnoty RGB. Měření bylo provedeno pod druhým tmavým pruhem praporu vně od ostnu a přibližně ve dvou třetinách pera vně od ostnu. Počet těchto bodů byl stanoven s ohledem na velikost křídélka a podobnost barvy.



Obr. 14: Analýza barev RGB na křídélku v programu Photoshop.

bílý kroužek - snímané části pera pro analýzu RGB

červený kroužek - hodnoty RGB

Foto: Hlasivcová

3.3.2 Vyhodnocení barvy pomocí tzv. vzorníku barev

Vzorník barev byl vytvořen jako jednoduchá pomůcka, která je ideální pro informativní určení pohlaví ptáka. Původním účelem vzorníku byla analýza spodní části křídla z důvodu nerealizovatelného nafocení křídla v homogenním prostředí. Křídlo je ze své podstaty nepoddajné a nelze zajistit shodné natažení a uložení křídla všech exemplářů, takže by výsledky nebyly validní. Následně však byl vzorník využit i pro další zkoumané části ptáka, tedy sekundární letku a křidélko.

Vzorník je škálou barev, která je postupně odstupňována v osmi odstínech. Jednoduše určuje sytost barvy jednotlivých jedinců. Odstín ve škále 1 - 3 odkazuje na samce, samice vykazuje zbarvení ve škále 5 – 8. V případě, že zbarvení je shodné s hodnotami škály 3 – 5, tedy že barvu křídla pokrývá takzvané překrývací pásmo, nelze pohlaví ptáka touto metodou určit spolehlivě.

3.4 Určování pohlaví pomocí DNA

Rozbor DNA je nezbytně nutnou metodou ke spolehlivému určení pohlaví. Při vytváření studie byla tato metoda prováděna až po získání dostatečného množství materiálu. Vzorek DNA u ptáků se nejsnadněji získává z pera, protože je brk prokrven vlásečnicemi, které zde po vyjmutí z těla ptáka přetrvávají v suchém stavu. Později se tyto vlásečnice při pohledu proti světlu jeví jako „bílá vlákna“ (Řezníček, ústní sdělení). Materiál z poskytnutých sledovaných exemplářů pocházel z obrysového peří na zádech ptáků.

Odebraná pera byla uchovávána v mrazících boxech, aby byla zachována jejich kvalita. V případě, že by pera nebyla zamrazena, hrozilo by znehodnocení vzorku DNA pro další výkonné účely.



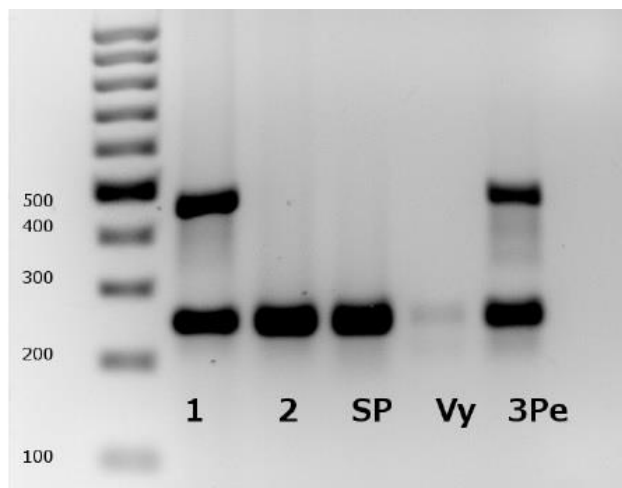
Obr. 15: Detail brku pera. Foto: www.shannonryanart.com

K určení pohlaví ptáků se využívá gen CHD¹⁰, který kóduje protein, jež reguluje aktivaci transkripce na úrovni chromatinu. Tento gen je u ptáků lokalizován v pohlavních chromozomech. Pomocí PCR je namnožena DNA odpovídající části genu na chromozomu W (CHD-W) a na chromozomu Z (CHD-Z) (Cerit and Avanus, 2006, Itoh et al., 2001).

Rozdíl v pohlaví znázorňuje obrázek 13. Pokud se na gelu objeví dva proužky, jedná se o samici, protože vyšší proužek odpovídá naštěpenému CHD-W. Druhý proužek je menší přibližně o 50 párů bází. Samci mají tedy proužek jeden. Dále byla porovnána vycpanina

¹⁰ Chromo-Helicase-DNA binding

kalouse. Z obrázku je patrné, že síla nukleotidů u starých vycpanin slábne, a proto není vhodné používat vycpaniny jako materiál pro určování pohlaví pomocí DNA. Pro kontrolu funkčnosti byla použita pera sovy pálené, která potvrzují, že je metoda vhodná i pro další druhy sov.



Obr. 16: Výsledek gelové elektroforézy z krycího peří.

1 – samice
 2 – samec
 SP – sova pálená, samec
 Vy – vycpanina kalouse
 3Pe – kalous č. 3 (samice)
 Foto: Mgr. Milan Bláha

3.4.1 PCR

Seznam použitých zkratk v této kapitole:

CCD	Charge Coupled Devices
DNA	kyselina deoxyribonukleová
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
SDS	dodecylsírán sodný
TAE	tri-acetátový pufr

Určování pohlaví ptáků je poměrně problematické (Grifiths et al., 1998), ale díky neinvazivnímu odběru vzorků, extrakci DNA a gelové elektroforéze, je právě PCR vhodná metoda pro určování pohlaví ptáků (Brubaker et al., 2011).

Následující tabulka stručně charakterizuje postup PCR.

primer pohlaví	USP1 / NRD4
Sekvence	CTATGCCTACCACMTTCCTATTTGC / TCAGAGCACTCTTTCCAGGAA
Denaturace	95°C, 80 sek.
připojení primerů	59°C, 90 sek.
syntéza vlákna DNA	72°C, 60 sek.
počet cyklů	35

Metoda byla zahájena extrakcí genomové DNA. Jak již bylo uvedeno výše, konec brku je protkán krevními vlasečnicemi, v nichž i po vyjmutí z těla ptáka zůstává zaschlá krev. Jádra bílých krvinek, která byla derivována přibližně z 1 ml heparinizovaného vzorku krve, vytvořila vysokomolekulární genomovou DNA. Tento postup byl proveden podle Gemmell a Akiyama (1996 ex. Itoh et al., 2001). Za přítomnosti kapalného dusíku byl v třecí misce rozdrčen vzorek tkáně. Vzniklý prášek byl suspendován ve fyziologickém roztoku (PBS) (10 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) s obsahem 10 mM ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA). Suspenzační směs byla centrifugována při 300G po dobu deseti minut, následně byla v PBS resuspendována a znovu centrifugována. Další suspendace probíhala v 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM EDTA (pH 8,0) a inkubovala se v přítomnosti 0,5% dodecylsírany sodného (SDS), 100 g/ml proteinázy K v 50°C. V této teplotě byla směs uchována přes noc. Následně byla směs extrahována s fenolem nasyceným TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA] směsí nasyceného fenolu a chloroformu v poměru 1:1, a chloroformem. Supernatant byl naředěn pufrům TE (Itoh et al., 2001).

PCR byla provedena v 50:1 směsi obsahující 0,2 mM každého z dNTP, 0,4 mM každého z primerů, 10 ng genomové DNA, 1,75 jednotky Taq polymerázy, a jedné desetiny objemu 10 PCR pufru. Dále byl rozdělen 1,5% agarózovým gelem v 1 TAE (10 mM Tris, kyselina octová 4 mM, 0,5 mM EDTA) při 100 V PCR produkt v 8:1 reakční směsi a barven s ethidium bromidem (Itoh et al., 2001).

PCR produkty byly klonovány s použitím pGEM-T vektoru. K sekvenci nukleotidů byly použity 21 M13 primery a M13 reverzní primerová barviva (Itoh et al., 2001).

4 Výsledky

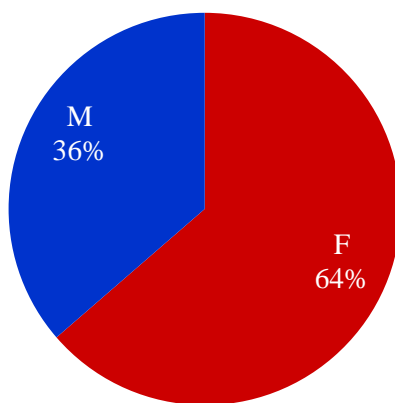
Celkově bylo použito 77 vzorků kalousů ušatých, které byly následně podrobeny několika typům měření s následujícími výsledky.

4.1 Měření PCR

Pomocí měření polymerázové řetězové reakce byly získány informace o vzorku k určení výsledků pohlaví. Celkově bylo analyzováno 77 vzorků, z toho 49 samic a 28 samců.

V následujících dvou kapitolách jsou samci vždy označeni M (male) a samice písmenem F (female).

celkový poměr počtu pohlaví kalouse ušatého ve studii



Graf 1: Celkový poměr počtu pohlaví kalouse ušatého.

číslo / kroužek	místo odchytu	pohlaví
1	Přerov	F
2	Přerov	M
3	Přerov	F
4	Přerov	M
5	Přerov	M
6	Přerov	F
7	Přerov	F
8	Přerov	F
9	Přerov	F
10	Přerov	F
11	Přerov	F
12	Přerov	F
13	Ruzyně	F
14	Ruzyně	M
15	Ruzyně	M
16	Ruzyně	M
17	Ruzyně	F
18	Ruzyně	F
19	Přerov	F
20	Přerov	F
21	Přerov	F
22	Přerov	F
23	Přerov	M
24	Přerov	M
25	Přerov	F
26	Přerov	F
27	Přerov	F
28	Přerov	M
29	Lednice	F
30	Lednice	M
D 142 665	Jinonice	F
D 142 682	Kladno	M
D 142 683	Kladno	F
D 142 684	Lednice	M
D 142 685	Kladno	M
D 142 686	Kladno	F
D 142 687	Kladno	F
D 142 688	Kladno	F
D 142 689	Kladno	F

D 142 690	Kladno	M
D 142 691	Kladno	F
D 142 692	Kladno	F
D 142 693	Kladno	F
D 142 694	Valtice	F
D 142 695	Valtice	F
D 142 696	Valtice	F
D 142 698	Březí	F
D 142 699	Březí	F
D 142 700	Březí	M
D 188 831	Kladno	M
D 188 829	Kladno	M
D 188 830	Kladno	F
D 195 967	Kladno	F
D 195 971	Kladno	F
D 195 972	Kladno	M
D 195 973	Kladno	F
D 195 974	Kladno	M
D 195 975	Kladno	M
D 195 976	Kladno	M
D 195 977	Kladno	M
D 195 978	Kladno	F
D 195 979	Kladno	M
D 195 980	Kladno	M
D 195 981	Kladno	M
D 195 982	Kladno	F
D 195 983	Kladno	F
D 195 984	Kladno	F
D 195 985	Kladno	F
D 195 986	Kladno	F
D 195 987	Kladno	F
D 195 988	Kladno	F
D 195 989	Drnholec	M
D 195 990	Lednice	M
D 195 991	Lednice	F
D 195 988	Kladno	F
D 207 802	Lednice	F
D 207 801	Lednice	M

Tabulka 2: Čísla označují kadávery, kroužky označují žijící jedince. Přehled jednotlivých vzorků určených podle analýzy DNA.

4.2 Biometrické měření křídélka

K posouzení barevnosti křídélka byly použity pera z vycpaných ptáků nebo z kadáverů. Vzhledem k tomu, že tento postup k bližší analýze vyžadoval vytržení pera z těla ptáka, množství vzorků bylo omezeno na celkový počet 15. Z per byl pomocí metody PCR ověřen počet samců a samic v poměru 6:9. Podle tohoto průzkumu bylo zjištěno, že všechny vzorky spolehlivě neodpovídají předpokladu o světlejších samcích a tmavších samicích

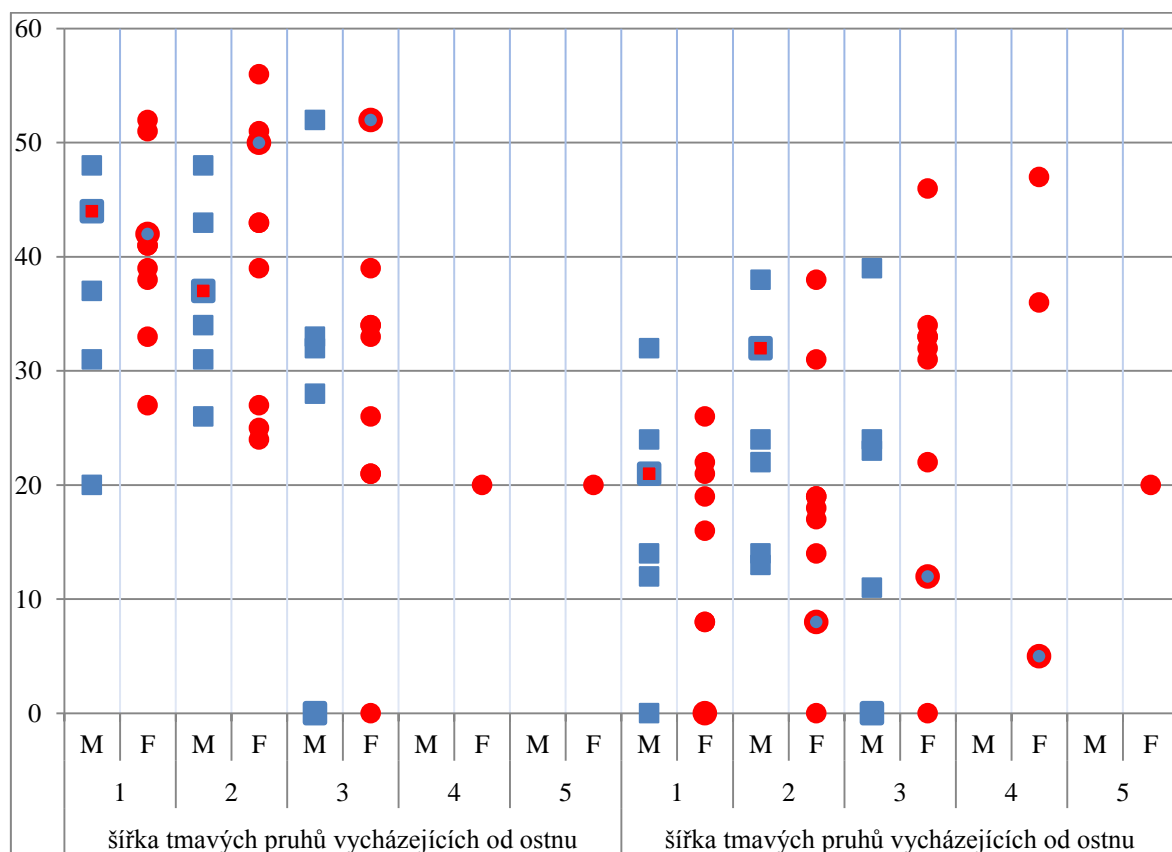
Tabulka č. 3 znázorňuje jednotlivá měření u křidélek. Z měření vyplývá, že velikostní rozdíly jsou sice měřitelné, ale nekorespondují s pohlavním dimorfismem kalouse.

			F	F	F	F	F	F	F/M	F	F	M	M	M/F	M	M	M
šířka tmavých pruhů vycházejících od ostnu	1	F	27	52	41	41	39	51	42	33	38						
		M										44	31	44	48	20	37
	2	F	39	56	51	43	27	25	50	43	24						
		M										26	34	37	48	31	43
	3	F	33	34	39	34	21	0	52	26	21						
		M										28	33	0	0	32	52
	4	F	0	20	0	0	0	0	0	0	0						
		M										0	0	0	0	0	0
	5	F	0	20	0	0	0	0	0	0	0						
		M										0	0	0	0	0	0
šířka tmavých pruhů vycházejících od ostnu	1	F	8	19	22	8	21	26	0	0	16						
		M										24	12	21	14	32	0
	2	F	19	18	17	19	0	38	8	14	31						
		M										38	22	31	14	24	13
	3	F	22	46	33	34	31	0	12	32	33						
		M										39	23	0	0	24	11
	4	F	0	20	0	0	0	0	0	0	0						
		M										0	0	0	0	0	0
	4	F	0	20	0	0	0	0	0	0	0						
		M										0	0	0	0	0	0

Tabulka 3: Hodnoty získané biometrickým měřením křídélka.

V následujícím grafickém znázornění je vždy samec označen modrou barvou ve tvaru čtverce a samice červenou v kruhu. U obou pohlaví se našlo jedno pero, které se vychylovalo od normálu a mělo znaky shodné s opačným pohlavím. Tyto dva vzorky jsou v grafech označeny dvěma barvami, kdy vnitřní barva vyznačuje potvrzené pohlaví pomocí PCR, avšak podle pravidel barevného rozlišování zdánlivě působí jako opačné pohlaví.

Graf 2 předchozí tvrzení potvrzuje. Je tedy zřejmé, že je tato metoda měření k účelu určení pohlaví neprokazatelná.



Graf 2: Celkové znázornění biometrického měření křídélka.

4.3 Spektrální analýza barvy

Výsledky měření hodnot spektrální analýzy barvy vycházely z metodiky v předchozí kapitole 3.3.1 (Spektrální analýza barvy). Pomocí této metody byla analyzována sekundární letka a křídélko. Získané hodnoty z těchto částí byly převedeny do programu Microsoft Excel a pomocí vytvořených grafů následovalo porovnání všech vzorků.

4.3.1 Spektální analýza barvy u sekundární letky

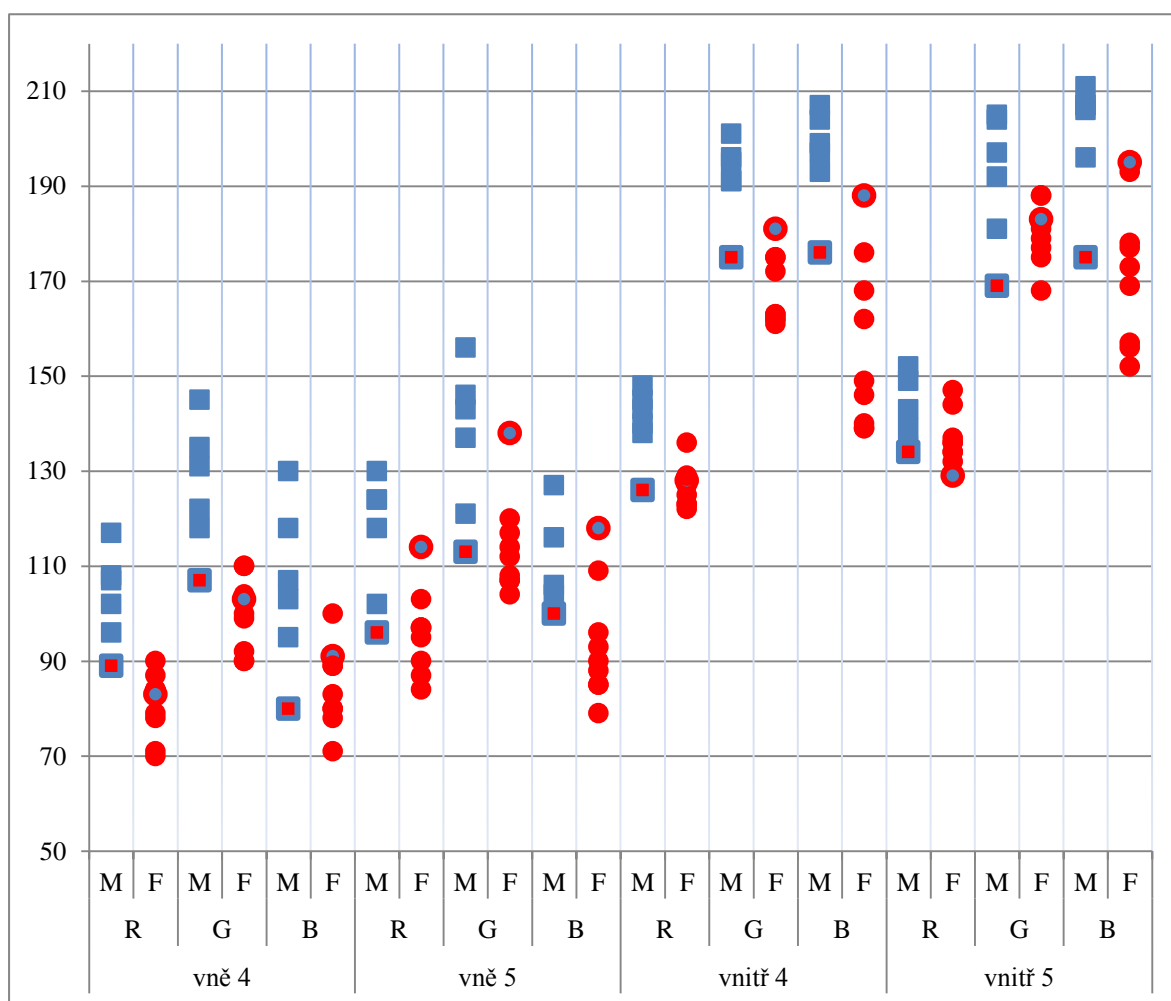
Určování barevnosti sekundární letky bylo prováděno pomocí čtyř bodů určujících hodnoty RGB (red, green, blue) podrobně popsané v kapitole 3.3.1.1 (Spektrální analýza u sekundární letky). K posouzení barevnosti vnitřní a vnější části praporu sekundární letky pod čtvrtým tmavým pruhem byly použity dva zdroje. Prvním zdrojem byla pořízená fotografie na živém ptákově během kroužkování. Druhým zdrojem byla samotná sekundární letka získaná z vycpaných ptáků nebo z kadáverů.

			F	F	F	F	F	F	F/M	F	F	M	M	M/F	M	M	M
vně 4	R	F	78	87	79	84	84	71	83	90	70						
		M										96	107	89	102	108	117
	G	F	90	100	99	104	110	92	103	110	90						
		M										118	131	107	122	135	145
	B	F	71	80	78	89	100	83	91	89	80						
		M										103	95	80	107	118	130
vně 5	R	F	97	103	97	90	95	87	114	97	84						
		M										102	118	96	130	124	124
	G	F	107	117	114	107	120	108	138	112	104						
		M										121	137	113	143	146	156
	B	F	79	93	85	88	109	96	118	85	90						
		M										100	106	100	127	116	104

vnitř 4	R	F	136	128	127	123	125	123	128	122	129						
		M										140	145	126	148	138	143
	G	F	175	162	163	172	175	161	181	163	162						
		M										191	195	175	201	191	196
	B	F	162	146	139	168	176	140	188	149	139						
		M										193	197	176	207	199	204
vnitř 5	R	F	147	134	132	144	136	137	129	134	136						
		M										135	149	134	152	139	143
	G	F	181	168	183	188	188	179	183	175	177						
		M										191	204	169	205	192	197
	B	F	156	152	173	178	193	177	195	157	169						
		M										196	207	165	211	206	207

Tabulka 4: Celkové znázornění výsledných hodnot RGB na sekundární letce.

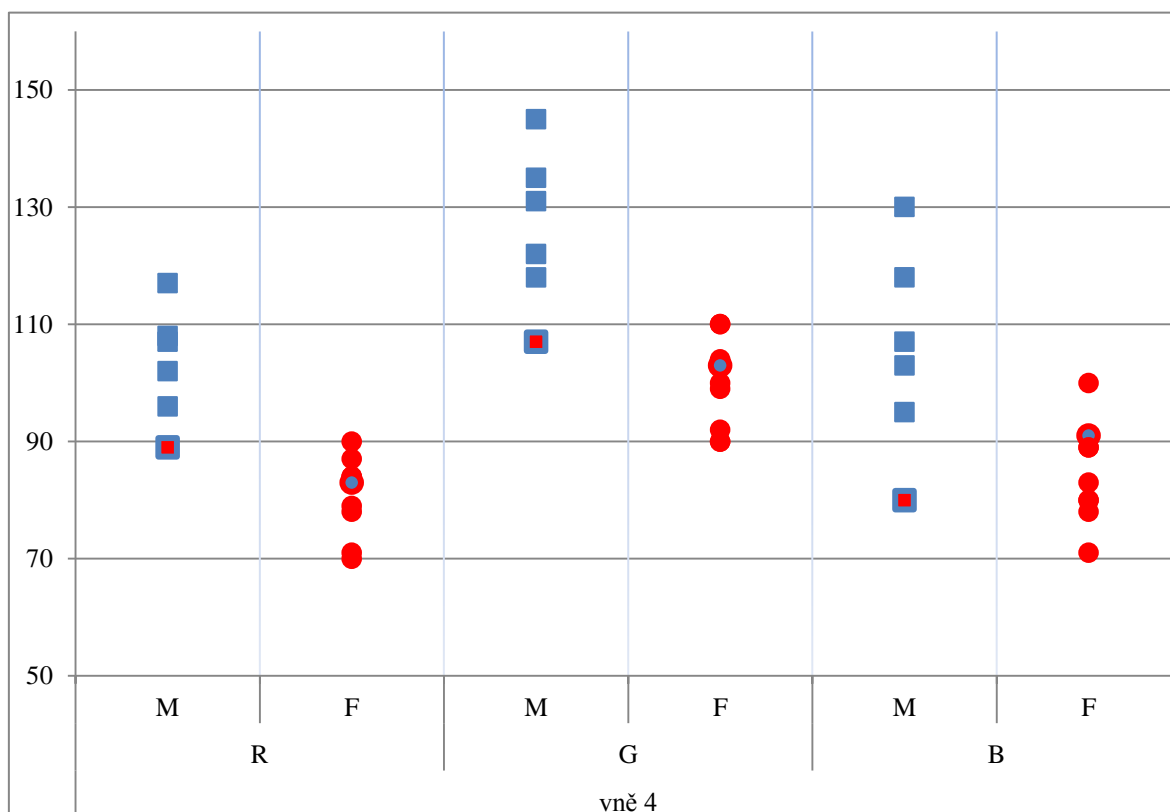
Z celkového souhrnu (graf 3) lze konstatovat, že nejzřetelnější barevné rozdíly v pohlaví jsou pozorovatelné na peru z vnější části od ostnu. Měření bylo provedeno pod čtvrtým a pátým pruhem od špičky pera. Výsledky odpovídají hypotéze, že samci jsou světlejší než samice. Zároveň se ukazuje, že pro určování pohlaví jedince podle zbarvení peří je spolehlivější orientace podle vnější strany praporu.



Graf 3: Celkové znázornění měření RGB na sekundární letce.

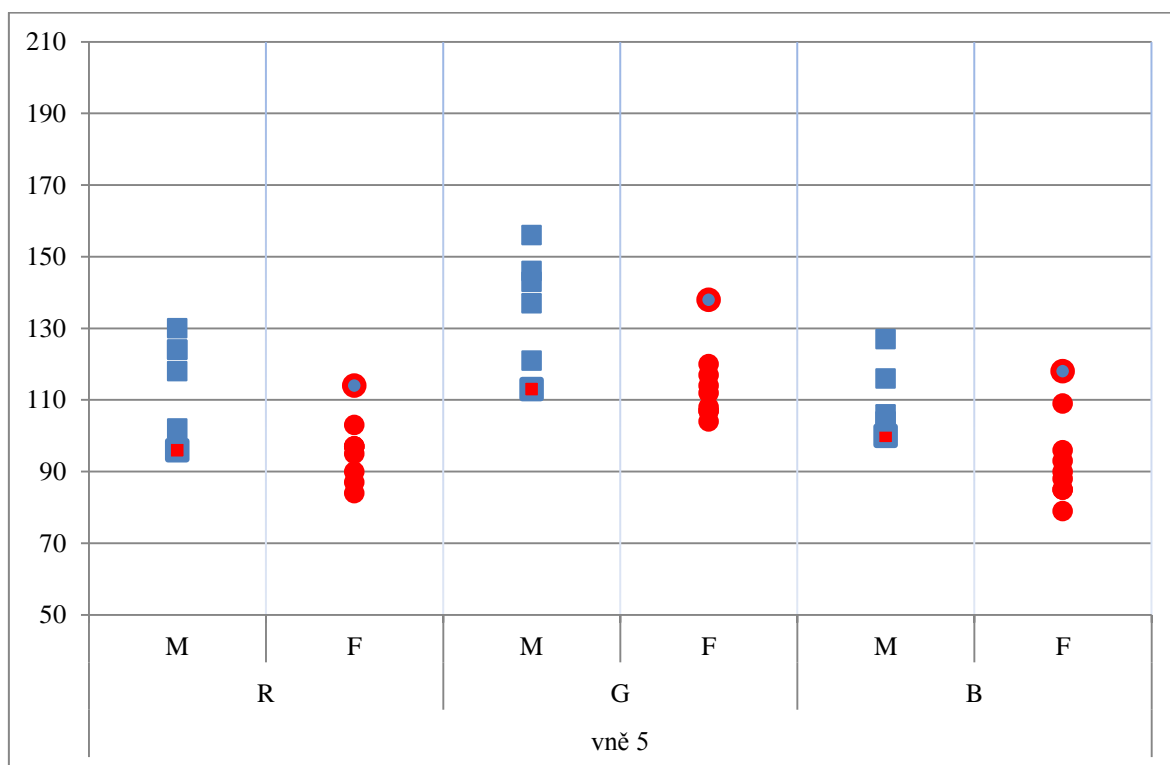
Ve čtvrtém grafu je detailně znázorněna barva pera pod čtvrtým tmavým pruhem od špičky pera, který se nachází z vnější strany praporu. Tato část je nejlépe zřetelná ze všech měřených bodů a snadno tedy určuje rozdíly mezi oběma pohlavími.

Peří samců je výrazně světlejší ve všech základních barvách RGB. Naměřené hodnoty se zde pohybují nápadně výše než u samic, v barevné škále R je průměrná hodnota 103,17 a rozptyl těchto vzorků je v rozmezí od 89 do 117. Samice jsou zřetelně tmavší, což dokládá průměrná hodnota 80,67, rozptyl se pohybuje od 71 do 90. Hodnoty ve škále G jsou u obou pohlaví vyšší, takže je tato část u obou pohlaví nejsvětlejší. Průměrná hodnota je u samců 126,33 a rozptyl vzorků je od 107 do 145. Samice mají průměrnou hodnotu 99,78 a jejich rozptyl se pohybuje mezi 90 a 110. V barevné škále B dosahují výsledky samců průměrných hodnot 105,5 a rozptyl se pohybuje v rozmezí 80 a 130. Samice mají průměrné hodnoty nižší, a to 84,56. Jejich rozptyl se nachází v hodnotách od 71 do 100.



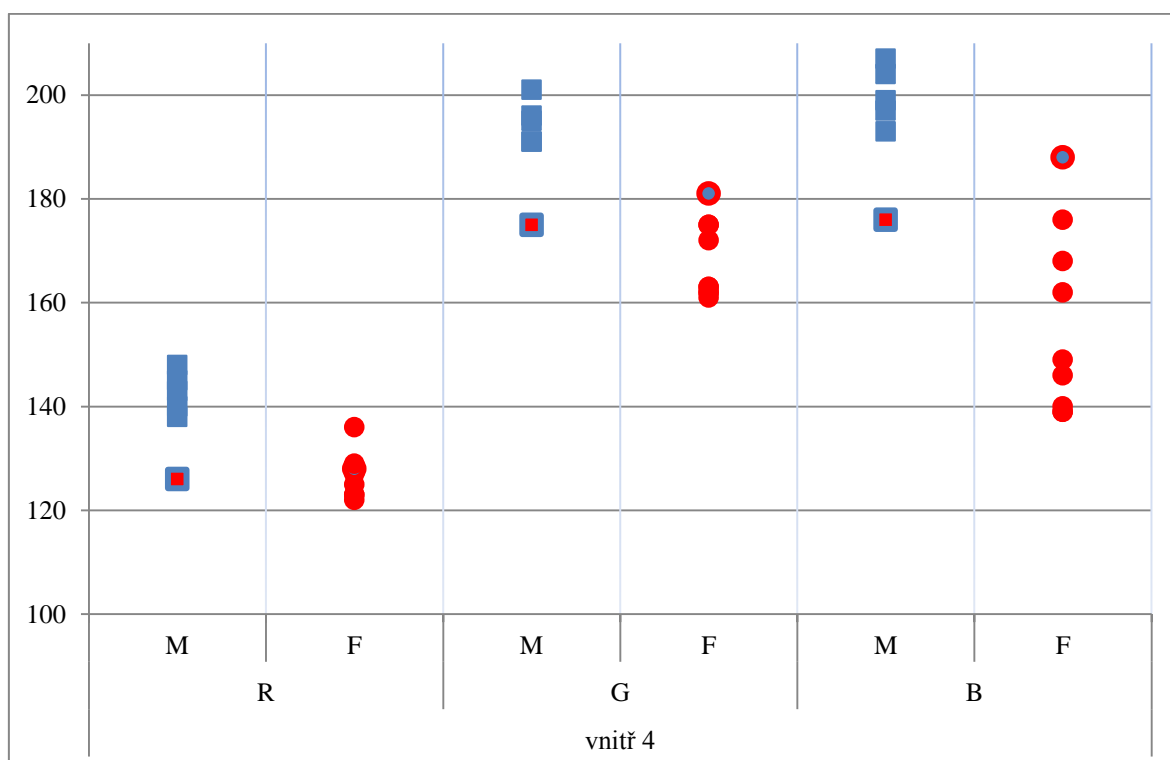
Graf 4: Znázornění měření RGB čtvrtého bodu pod tmavým pruhem z vnější části od ostnu na sekundární letce.

Pátý graf zobrazuje opět vnější část praporu, ale v kontrastu s předchozím grafem se zde porovnávalo zbarvení letek pod pátým pruhem od špičky pera. Výsledky poměrně jasně ukazují, že tato část pera nevykazuje tak zřetelný rozdíl jako v měření zbarvení pod čtvrtým pruhem. V R škále výsledky odpovídají rozdílnosti v barevnosti pohlaví. Samčí průměr sytosti barvy je 115,67. Oproti tomu samičí průměr sytosti je 96. V druhé škále barvy G je rozptyl jednotlivých vzorků obdobný. Samičí průměr je 114,11. Samčí průměr dosahuje hodnoty 136. V případě, že by do výsledků nebyla zahrnuta výjimečná hodnota samičí letky (hodnota 138), která je v množství vzorků anomální, byl by rozdíl v porovnání obou průměrů velký. Ve třetí barevné stupnici je znázorněno, že jsou samice v průměru nejtmavší. Toto tvrzení dokazuje průměr hodnot, který je 93,67. Samci dosahují průměrných hodnot 108,83. Rozptyl jednotlivých vzorků není velký. Samice však tento rozptyl mají výraznější.



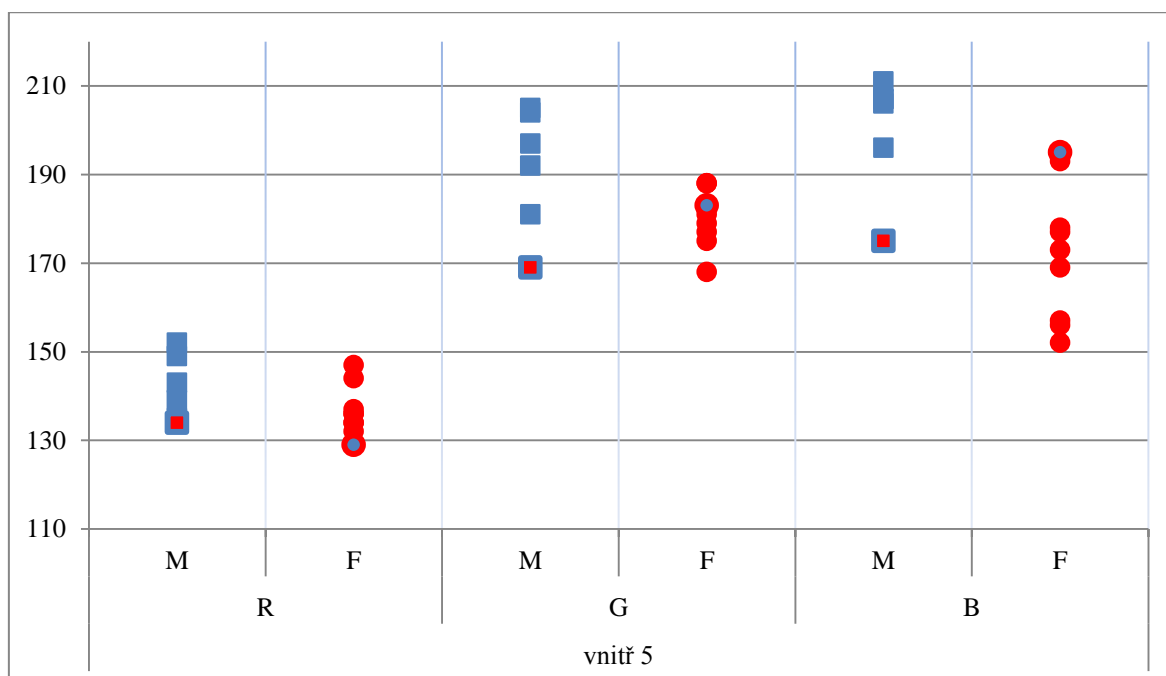
Graf 5: Znázornění měření RGB pátého bodu pod tmavým pruhem z vnější části od ostnu na sekundární letce.

Další dva grafy znázorňují výsledky měření na vnitřní části praporu. První z těchto grafů (6) znázorňuje souhrn měření vnitřní části pera pod čtvrtým pruhem praporu. Ze získaných hodnot vyplývá, že samice mají sytější barvu letek a samci světlejší. Barevná škála R značí průměr vzorků samců, který je 140 a průměr samičích vzorků 126,78. Pokud by se nepočítal nejtmavší samec (který barevně odpovídá samici) s hodnotou 126, celkový průměr by stoupl na 142,8, poté by byl rozdíl mezi pohlavími jasně zřetelný. Samice v této části měření měly vůbec nejmenší rozptyl z celého měření letek – jen 13. Následující škály G a B ukazují, že zbarvení samců je opět světlejší než samic. Hodnoty samců v průměru dosahují v G škále 191,5. Oproti tomu samice mají průměrnou hodnotu 168,22. V B měření mají samci průměrnou barvu 196. Samice mají v této části největší rozptyl hodnot ze všech částí praporu. Minimální hodnota je 139. Maximální hodnota je 188. Rozdíl je tedy celých 49. V případě, že by bylo vynecháno pero, které podle pozorování barevně odpovídá samci, tento rozdíl by klesnul na hodnotu 37.



Graf 6: Znáornění měření RGB čtvrtého bodu pod tmavým pruhem z vnitřní části od ostnu na sekundární letce.

V grafu sedm, který znázorňuje barevnou sytost pod pátým vnitřním pruhem od špičky praporu, výsledky opět naznačují, že je samec světlejší barvy. Ve škále R jsou hodnoty samce se samicí velmi podobné. Jejich tmavší a světlejší hranice se pohybuje v obdobném rozmezí. Tmavší hranice je u samce 134 a samice 129. Horní hranice, tedy zobrazení světlé barvy je u samců v nepatrně větším rozptylu oproti samicím. U samců je tato hodnota 152, u samic 147. Zbylé dvě škály barev G a B již odhalují znatelnější známku pohlavního dimorfismu. Ve škále G je rozptyl samčích vzorků výrazně větší než rozptyl samic. Minimem je hodnota 169 a maximem hodnota 205. Oproti tomu samice dosahují velmi jednotné barvy. Jejich rozptyl je od 168 do 188. Posledním měřeným bodem v této části křídla je bod B. Výsledky obou pohlaví jsou ve velkém rozptylu a částečně se překrývají. Samci mají průměrnou hodnotu 200,33, nejvyšší 211, která je nejsvětlejší z celého měření na praporu. Spodní hranici určuje vzorek, který se podobá samici a dosahuje hodnoty 175. Samičí zbarvení praporu také vykazuje velký rozptyl. Jejich průměrná hodnota je 172,22. Nejsytější vzorek má hodnotu 152 a nejsvětlejší 193. Z grafu je také patrné, že se hodnoty samce se samicí částečně překrývají.



Graf 7: Znázornění měření RGB pátého bodu pod tmavým pruhem z vnitřní části od ostnu na sekundární letce.

4.3.2 Spektrální analýza barvy u křídélka

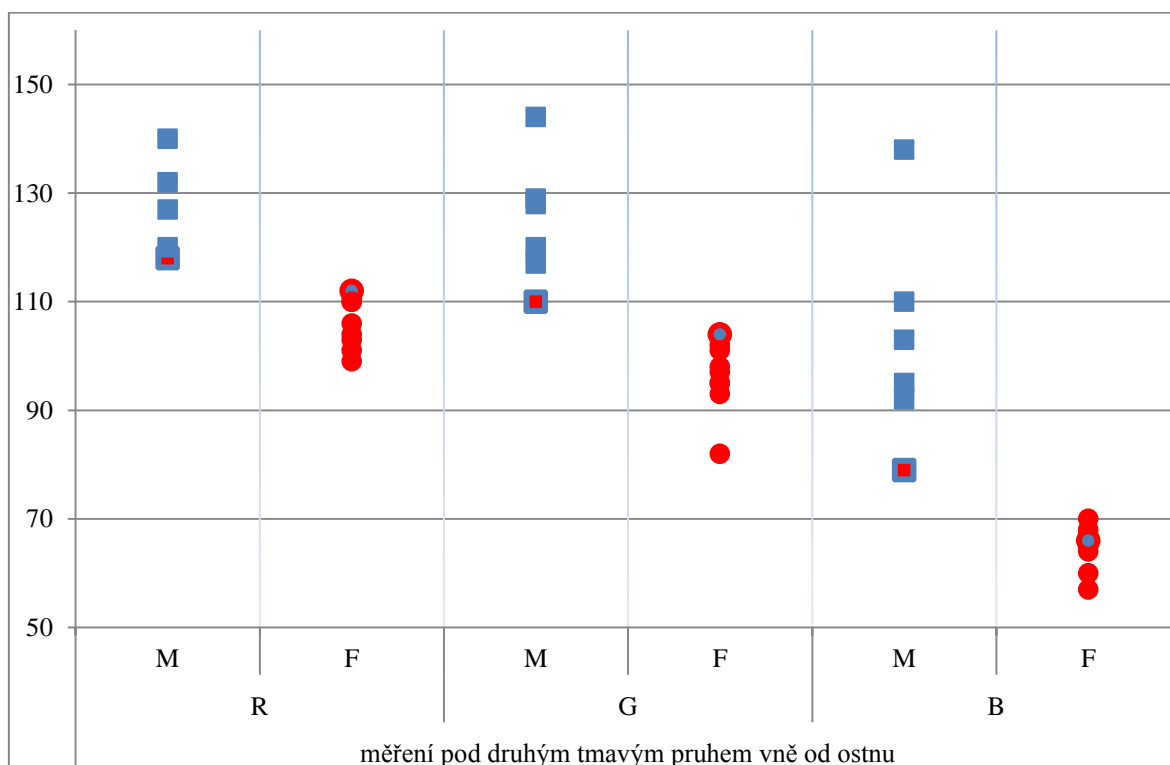
I u křidélek kalousů byla aplikována metoda vytvoření barevné škály RGB podobně jako na sekundárních letkách. V tomto případě byly použity dva body, ze kterých se snímaly hodnoty RGB, měření bylo provedeno z vnější strany praporu pod druhým tmavým pruhem od špičky pera ve dvou třetinách pera vně od ostnu (jak bylo uvedeno v kapitole 3.3.1.2 Spektrální analýza barvy u křídélka).

			F	F	F	F	F	F	F/M	F	F	M	M	M/F	M	M	M
měření pod 2 tmavým pruhem vně od ostnu	R	F	110	111	103	101	106	99	112	110	104						
		M										127	118	118	132	140	120
	G	F	98	102	95	93	82	95	104	101	97						
		M										95	103	79	110	138	92
	B	F	68	65	64	57	47	67	66	60	70						
		M										119	130	110	118	143	129
měření ve 2/3 pera vně od ostnu	R	F	109	108	106	106	104	96	115	109	84						
		M										110	137	107	119	146	117
	G	F	103	102	101	100	88	65	114	105	104						
		M										110	137	113	143	146	156
	B	F	83	69	88	65	51	79	91	72	90						
		M										104	135	84	119	147	131

Tabulka 5: Souhrnné znázornění výsledných hodnot RGB na křídélku.

Hodnoty získané analýzou RGB byly následně přeneseny do grafického znázornění.

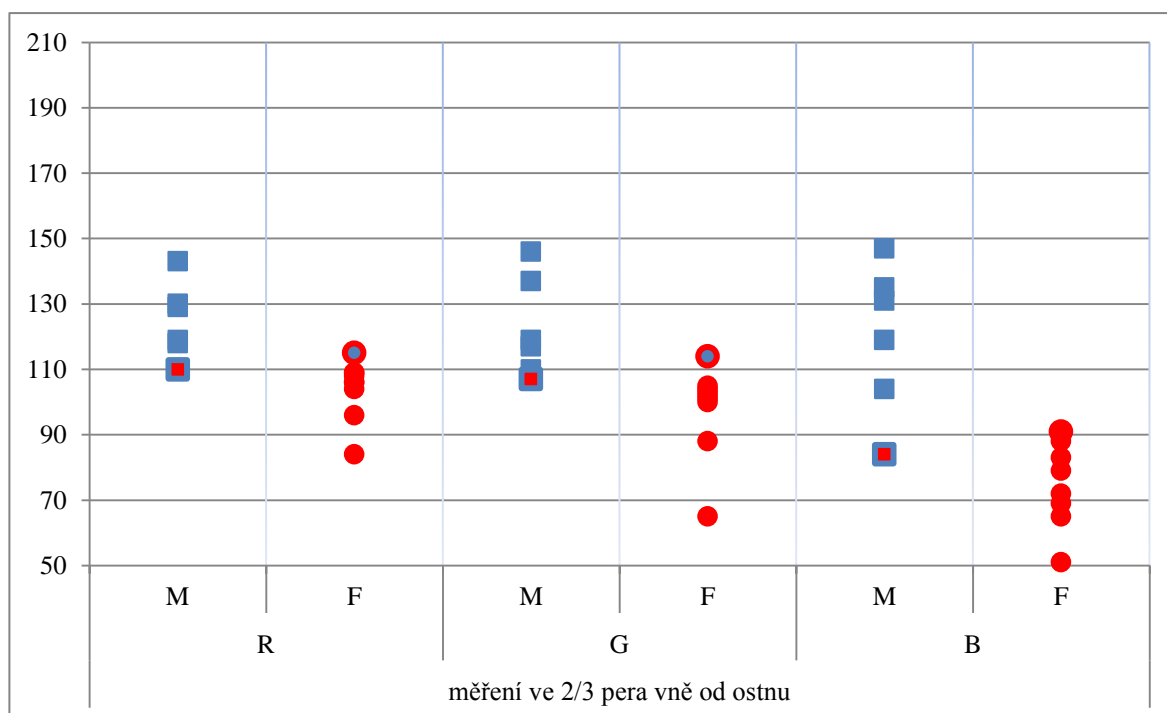
První z těchto grafů (graf 8m) znázorňuje hodnoty pod druhým tmavým pruhem vně od ostnu. Ze všech hodnot zřetelně vyplývá, že samice mají sytější barvu oproti samcům. V barevné škále R dosahují samci průměrné hodnoty 125,8. Jejich rozptyl se pohybuje v rozmezí 22 bodů. Oproti tomu samice mají v této škále průměrnou hodnotu 106,2. Rozptyl jejich hodnot je pouhých 12, což je nejmenší rozdíl měřený na křídélku. V barevné škále G jsou také velmi zřejmé rozdíly v sexuálním dimorfismu kalousů. U samců je průměr hodnot 124,7 s maximální hodnotou 144 a minimální hodnotou 110. Samice mají průměrnou hodnotu 96,33, jejich maximální a minimální hodnota je 104 a 82. Ve škálebarvy B jsou opět velké rozdíly mezi barvou pohlaví. Samci dosahují průměrných hodnot 102,8. Rozptyl je poměrně velký - 59. Samice mají hodnoty vyrovnanější. Jejich průměrná hodnota je 62,67, jejich hodnoty dosahují maxima 70 a minima 47.



Graf 8: Znázornění měření RGB pod druhým tmavým pruhem z vnější části od ostnu na křídélku.

Další graf (graf devět) se zaměřuje na měření barvy ve dvou třetinách pera z vnější strany praporu. Oproti předchozímu grafu se hodnoty mírně překrývají, přesto však dochází k evidentnímu barevnému sexuálnímu dimorfismu u všech třech porovnávaných barevných škál.

První barevná škála R má u samců průměrnou hodnotu 124,8. Z grafu je dobře patrné, že samec, který na první pohled připomíná samici, dosahuje nejnižší hodnoty. Jednotlivé hodnoty jsou v rozptylu 33. Jedná se o nejmenší rozptyl naměřený u samců v této části pera. Samice dosahují při měření ve dvou třetinách pera průměrné hodnoty 104,1 a hodnoty rozptylu podobně nízké jako u samců - 31. V této škále dochází k překrývání barvy pohlaví u dvou jedinců - jednoho samce (hodnota 110) a jedné samice (hodnota 115). Poslední ze tří barevných škál B vyjadřuje, že samci mají průměrnou hodnotu 120. Jejich rozptyl je 63 a je největší z celkového měření křídélka. Maximální hodnota je 147 a minimální hodnota 84. Samice mají průměrnou hodnotu 76,44. Jejich rozptyl je menší a vyváženější, dosahuje hodnoty 40. Vzhledem k tomu, že je samičí maximální hodnota 91, dochází k překrývání barvy pohlaví u dvou samic (hodnoty 91 a 90) a jednoho samce (hodnota 84).

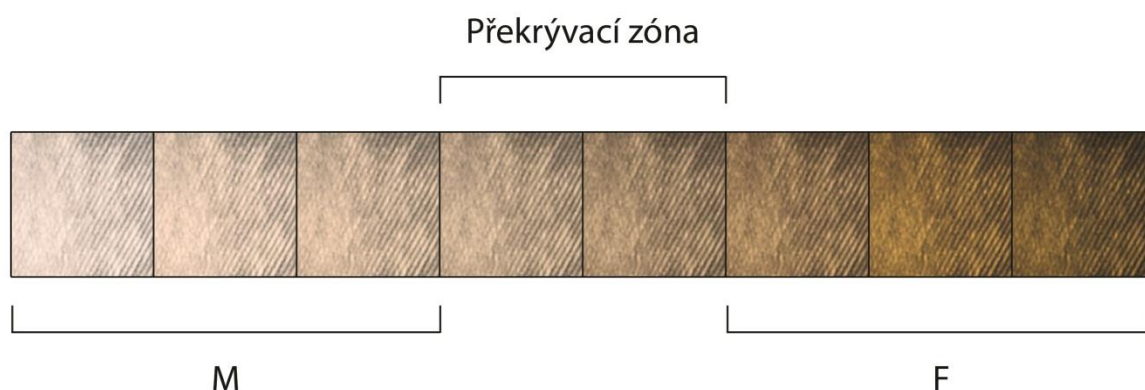


Graf 9: Znáornění měření RGB ve dvou třetinách pera z vnější části od ostnu na křídélku.

4.4 Vyhodnocení barvy pomocí vzorníku barev

Studiem jednotlivých částí opeření kalouse ušatého bylo určeno, že samci mají méně oranžové barvy a oproti samicím mají celkově světlejší barvu. Na základě tohoto zjištění bylo definováno osm stupňů barevné sytosti a vytvořen vzorník barev v jednotlivých zkoumaných částech těla ptáka. Jedná se tak o nejjednodušší metodu pro určování pohlaví kalouse. Nejsvětější tři pole byla stanovena pro samce a nejtmaší tři pole vymezena pro samici. Vzhledem k tomu, že se jedná o živé tvory, v barevnosti se objevují individuální odchylky, proto byla vytvořena překrývací zóna.

4.4.1 Vzorník barev u sekundární letky



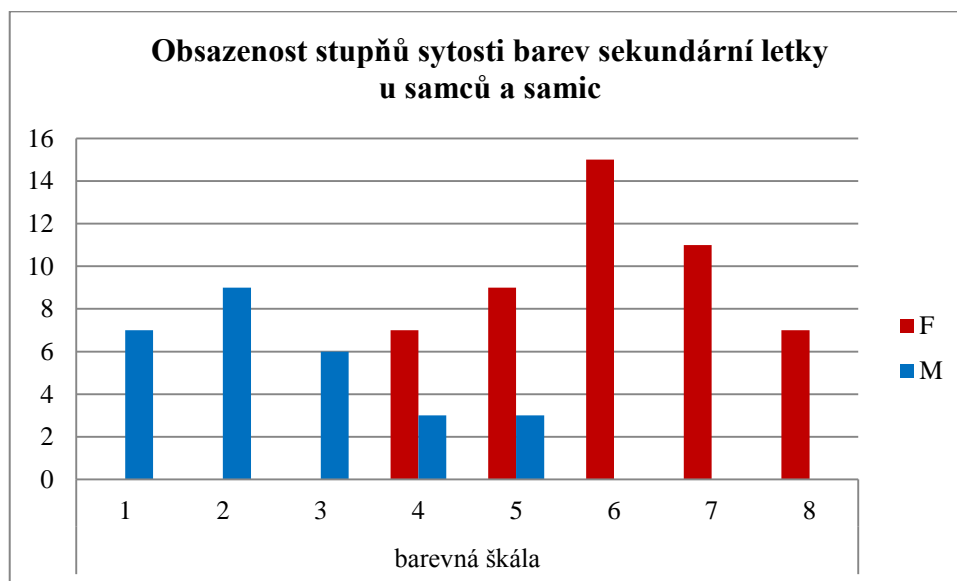
Obr. 17: Vzorník barev sekundární letky.

Pomocí vytvořeného vzorníku barev došlo k porovnávání jednotlivých vzorků sekundárních letek kalousů. Barva byla porovnávána pod čtvrtým tmavým pruhem vnější části od ostnu. Tento pruh je počítán od špičky pera. Zkoumaná část pera vykazuje podle měření RGB nejspolehlivější rozdíly mezi pohlavími. Výsledky obsazenosti jednotlivých stupňů sytosti barvy jsou přehledně znázorněny v tabulce šest a grafu 10. Jednotlivé hodnoty naznačují, že samice hojně dosahují velké sytosti rezavohnědé barvy. Největší frekvenci v barevné stupnici mělo pole šesté a sedmé. Výskyt syté barvy byl poměrně

vysoký i u vzorků, které se nacházely v překrývací zóně. Graf naznačuje, že samci jsou povětšinou jasně světlejší než samice, protože první a druhý stupeň měl nejčastější obsazenost. V překrývací zóně se nacházelo šest vzorků per určující samčí pohlaví a 15 per určující samičí pohlaví.

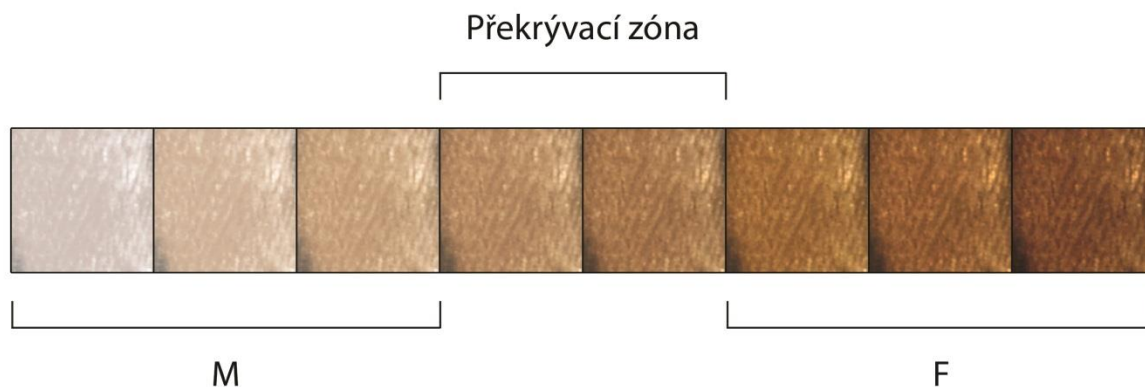
	barevná škála							
	1	2	3	4	5	6	7	8
F	0	0	0	7	9	15	11	7
M	7	9	6	3	3	0	0	0

Tabulka 6: Obsazenost stupňů sytosti barev sekundární letky u samců a samic.



Graf 10: Grafické znázornění obsazenosti stupňů sytosti barev sekundární letky u samců a samic.

4.4.2 Vzorník barev u křídélka

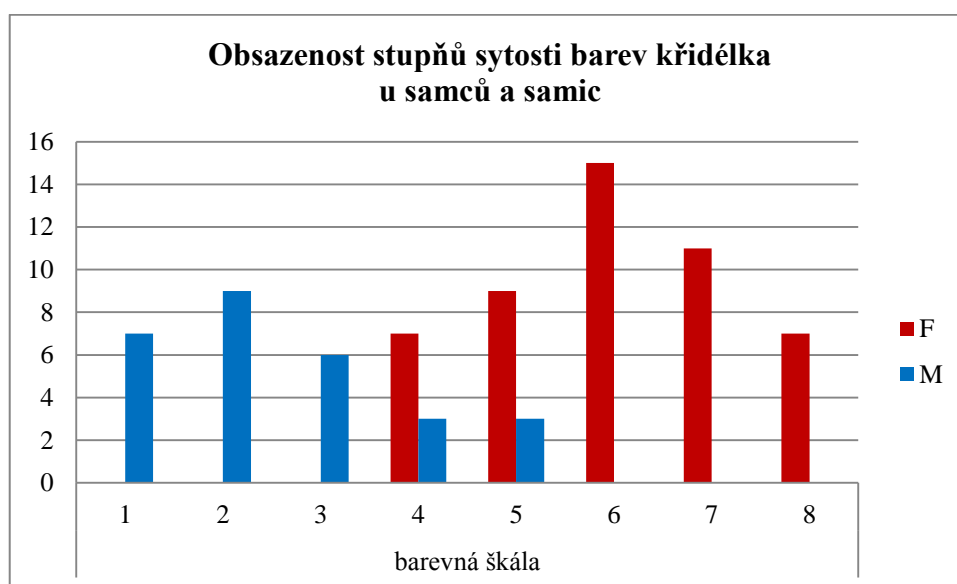


Obr. 18: Vzorník barev sekundární letky.

Tabulka sedm a graf 11 znázorňují výsledky frekvence výskytu jednotlivých stupňů sytosti barvy křídélka. Hodnoty naznačují, že samci zřetelně vykazují světlejší barvu. To dosvědčuje fakt, že 20 vzorků z celkového souboru vzorků, obsadilo dvě nejsvětlejší pole. Samice naopak mají sytější barvu. Nejčastější obsazený stupeň u nich byl šest a sedm s 29 vzorky. Zajímavá je vysoká frekvence výskytu samičího pohlaví v překrývací zóně. Celkem 15 vzorků samic se z celkového počtu zařadilo do této oblasti. Oproti tomu samčí vzorky zónu obsadily v menším počtu a v překrývacím stupni čtyři byl jen jeden vzorek.

	barevná škála							
	1	2	3	4	5	6	7	8
F	0	0	0	6	9	15	14	5
M	9	11	7	1	0	0	0	0

Tabulka 7: Obsazenost stupňů sytosti barev křídélka u samců a samic.



Graf 11: Grafické znázornění obsazenosti stupňů sytosti barev křídélka u samců a samic.

4.4.3 Vzorník barev u spodní části křídla

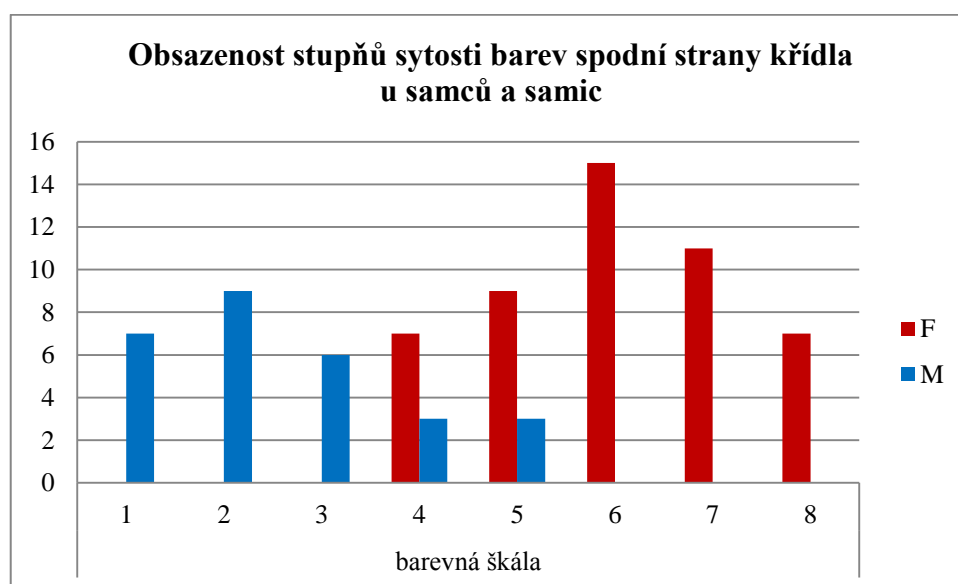


Obr. 19: Vzorník barev vnitřní části křídla.

Pomocí vytvořeného vzorníku barev došlo k porovnávání barevnosti jednotlivých vzorků perí kalousů. Výsledky obsazenosti jednotlivých stupňů sytosti barvy jsou přehledně znázorněny v tabulce osm. Jednotlivé hodnoty naznačují, že samice hojně dosahují velké sytosti rezavohnědé barvy. Celkem 40 vzorků obsadilo tři nejsytější stupně, devět vzorků se nacházelo v zóně, kde dochází k překrývání. Graf 12 naznačuje, že samci jsou povětšinou jasně světlejší než samice, protože první stupeň měl nejčastější obsazenost. V překrývací zóně se nacházelo šest vzorků.

	barevná škála							
	1	2	3	4	5	6	7	8
F	0	0	0	3	6	11	15	14
M	11	8	3	5	1	0	0	0

Tabulka 8: Obsazenost stupňů sytosti barev vnitřní části křídla u samců a samic.



Graf 12: Grafické znázornění obsazenosti stupňů sytosti barev apodní strany křídla u samců a samic.

5 Diskuze

V průběhu výzkumu jsem se zaměřila na fenotypové zbarvení u dichotomického pohlaví a zkontrolovala výsledky pomocí extrakce DNA metodou PCR.

Provedené a srovnané výsledky odhalují, že rozdíly mezi samcem a samicí kalouse ušatého lze určit na základě barevných odlišností. Přestože výsledky Martíneze et al. (2002) nevedly ke kvantifikovatelnému závěru, moje teorie se opravdu potvrdila.

5.1 Výzkumy pohlaví kalouse ušatého na území České republiky

Během dvou let vytváření studie bylo celkově získáno 77 vzorků kalouse ušatého. Sběr dat byl rozdělen na dvě etapy. V zimním období byli kalousi získáváni odchytem. Ve zbytku roku byli získáni ze záchranných stanic. Pomocí PCR bylo mezi exempláři zjištěno 28 samců a 49 samic.

Kalous ušatý se vyskytuje různě ve třech časově odlišných obdobích. První je období, které tráví kalousi na svých zimovištích od začátku října do poloviny března. Dalším obdobím je období hnízdění, období trvá od poloviny března do konce května. V tuto dobu kalousi migrují zpět na sever ze svého zimoviště. Posledním obdobím je období po hnízdění. Toto období trvá od konce května do konce září a spolu s předchozím obdobím hnízdění se řadí do letního období (Hudec a kol., 1983). Přítomnost kalouse ušatého závisí na dosažitelnosti potravy, proto o jeho výskytu v zimním období rozhoduje i teplota, a zda je přítomna sněhová pokrývka (Řezníček, 1981, Wijnands, 1983).

Poměr samců a samic v této studii odpovídá poměru exemplářů ve studii Eritzoea a Fullera (1999), kteří konstatovali, že se v zimním období ve střední Evropě vyskytují především samice. Jako jeden z důvodů uvádějí, že jsou samci menší a je pro ně fyzicky náročnější migrace na větší vzdálenost nebo přes moře, zatímco zdatnější samice se stahují jižněji do příznivějších podnebných pásem. Existuje i další teorie, že se ptáci ze severu dostávají do nižších zeměpisných šířek kvůli většímu množství denního světla, které je důležité pro urychlení nástupu ovulace (Řezníček, ústní sdělení). I Roulin (2013) přinesl vysvětlení, proč by se v zimním období na území České republiky mělo vyskytovat více samic. Jeho

výsledky zaznamenaly, že samice, které mají zpevněné letky melaninem, mají lepší letové předpoklady, neboť jejich pera jsou díky melaninu odolnější a pevnější a samice tedy mohou snadno doletět ze severu až do oblastí střední Evropy.

5.2 Rozdíly barevnosti v pohlaví

U sov je určení pohlaví na první pohled poměrně problematické z důvodu nevýrazného sexuálního dimorfismu. Předmětem výzkumu zbarvení kalouse ušatého, který se zaměřil na barevné rozdíly v pohlaví, se staly části určité části jeho opeření. Jednalo se o sekundární letku, křídélko, a spodní část křídla. Z výsledků lze vyvodit, že jsou patrné rozdíly v barevné sytosti obou pohlaví. Samice mají sytější, rezavohnědou barvu. Tato sytější barva je pozorovatelná na celém jedinci. Na křídélku, sekundární letce i na celém spodním křídle je však tato barevnost dobře rozlišitelná od barevné sytosti samce.

5.2.1 Křídélko

Jedním ze základních porovnávacích bodů na těle je křídélko. Pro výkumné metody tohoto bodu byl použit předpoklad Martíneze et al. (2002), že samice mají na křídélku tři a více tmavých pruhů, naopak samci mají maximálně dva tmavé pruhy. Z obrázku 14 vyplývá, že tento předpoklad nesouhlasí se vzorky z této studie. Je jasné patrné, že samci vždy dosahují minimálně jednoho a maximálně tří tmavých pruhů. Samice dosahují minimálně dvou a maximálně 4 tmavých pruhů, počet těchto pruhů je však povětšinou vyšší. Měření šířky tmavých pruhů vedoucího od ostnu nevedlo k podstatným výsledkům, proto jsem zhodnotila, že není vhodné podle šířky pruhů na křídélku posuzovat pohlaví jedince.

Dalším zkoumáním na křídélku byla jeho barva. Samice by podle Martíneze et al. (2002) měla mít sytější rezavohnědou barvu křídélka, což koresponduje i s výsledky této studie. Pro přesné určení sytosti barev bylo použito hodnocení pomocí RGB. Měření sytosti daných barev bylo provedeno ve dvou částech křídélka, pod druhým tmavým pruhem, který vedl z vnější strany praporu a ve dvou třetinách celého křídélka opět z vnější strany od ostnu. Podle výsledků lze usuzovat, že měření v horní části pera pod druhým pruhem

má stabilnější hodnoty a rozdíly mezi samcem a samicí se v žádném ze vzorků nepřekrývaly a jsou tedy spolehlivější. V druhém měření ve dvou třetinách pera docházelo k drobnému překrývání hodnot několika vzorků.

Barva křídélka kalouse byla také zkoumána pomocí vzorníku barev. Jako posuzovaná část bylo zvoleno místo pod pravým tmavým pruhem od špiček pera z vnější části praporu, díky jasným výsledkům hodnot RGB v odlišnosti barvy peří mezi samcem a samicí. Hodnoty naznačují, že jsou samci evidentně světlejší. Vzorky peří samic sice neměly největší obsazenost v nejsytějším poli, ale nejčastěji zaujímal zóny šest a sedm. Překrývací zóna byla v této části ptačího peří nejčastěji zastoupená oproti jiným částem. Především do ní byly zařazeny samice, samci obsadili pole čtyři jedním vzorkem a pole páté dokonce nikdy. Z toho důvodu lze zhodnotit, že by na křídélku mohla být jen jedna zóna, která by byla překrývací a došlo by tak ke snazšímu určování pohlaví ptáka.



Obr. 20: Porovnání barevnosti křídélka. Nahoře - samice, dole - samci. Foto Hlasivcová

5.2.2 Sekundární letka

Barevnost sekundární letky byla porovnáována pomocí měření hodnot RGB. Na letce byly vyznačeny čtyři body, ze kterých byly následně sebrány hodnoty vzorků. Hodnoty získané z bodů měřených z vnější strany praporu dosahovaly větších a spolehlivějších rozdílů oproti bodům měřených na jeho vnitřní části.

Měření pod čtvrtým pruhem z vnější strany od špičky pera dosahovalo největších rozdílů v sytosti barev mezi pohlavími. Pokud by nebyl použit vzorek, který se podle výsledků barevně neshodoval s barevností samce, protože je nepatrně tmavší a svou hodnotou by se dal zařadit do kategorie samic, došlo by jen k minimálnímu překryvu barev, který by byl pouhým okem doboře pozorovatelný. V dalších částech měření vzorky pocházející od samců vždy dosahovaly světlejší barvy oproti samicím, ale místo překrývání hodnot barevného spektra je výrazně větší. Z toho důvodu vyhodnocuji, že je nejspolehlivější určovat pohlaví kalouse podle čtvrtého pruhu vedoucího z vnější strany od ostnu.

Sekundární letka byla dále porovnáována pomocí vzorníků barev. Tato metoda je vhodná především tím, že není časově ani finančně nákladná. Nevýhodou použití vzorníku barev by mohla být neschopnost přesně rozlišit barvy.

Porovnáním jednotlivých vzorků se vzorníkem barev bylo shledáno, že je také možné využívat tuto metodu. Samci nejčastěji obsazovali zónu jedna a dva, samice naopak šest a sedm. Barevné pole čtyři a pět, které bylo nazváno jako překrývací zóna, bylo také zastoupené několika vzorky. U samců to bylo šest vzorků a u samic 15. Tento rozdíl by však neměl být přisuzován častěji světlejším samicím, protože je nutné přihlédnout k faktu, že celkový počet samic byl v této studii více než dvojnásobný.



Obr. 21: Porovnání barevnosti sekundární letky. Vlevo – samec, vpravo – samice. Foto: Hlasivcová

5.2.3 Spodní část křídla

Velikost a nepoddajnost křídla znesnadňuje relevantní analýzu jeho spodní části, protože pro měření nelze zajistit vždy shodné podmínky (roztažení, uložení křídla) ani homogenní prostředí. Proto byla vynechána analýza RGB a místo ní byl použit vzorník barev. Z výsledků vyplývá, že uplatnění vzorníku barev je vhodnou metodou k určování pohlaví. Vzorky pocházejících od samců nejčastěji obsazovaly první dva stupně sytosti barev. Barva samic obsazovala více polí, avšak nejčastěji se barvy pohybovaly v šesté až osmé zóně. Barevné pole čtyři a pět, které byla nazváno jako překrývací zóna, bylo také zastoupené několika vzorky. U samců to bylo šest vzorků a u samic devět.



Obr. 22: Porovnání barevnosti vnitřní části křídla.
Nahoře – samice, dole – samec. Foto: Hlasivcová

5.2.4 Další části hodnocení barevnosti pohlaví

V průběhu pozorování došlo k odhalení dalšího znaku sexuálního dimorfismu - peří kryjící nohy kalousů má také charakteristické zbarvení pro obě pohlaví. Nohy samců jsou zbarvené do světla, naopak samice zde mají peří naoranžovělé. Ke zjištění došlo při odchytu samce a samice ve stejnou dobu.



Obr. 23: Nohy kalousů ušatých. Vlevo – samec, vpravo – samice. Foto: Hlasivcová

Pozornost v této práci byla zaměřena i na ocas kalousů. Vzhledem k velikosti ocasu nebylo možné provést měření hodnot RGB, stejně jako ve spodní části křídla. Vzorník nebyl vytvořen s toho důvodu, že rozdíly v barvě peří byly jen nepatrné a nebylo by možné vytvořit stupnici barev, která by měla jasně odstupňované odstíny. Z toho důvodu lze konstatovat, že ocas není vhodným určovacím znakem pro rozlišení pohlaví. Přesto se dají na ocasu prokázat jiné znaky, které vypovídají o stáří jedince. Určujícími znaky je šířka tmavých pruhů. Starší jedinci mají tyto pruhy silnější. Dále u starších ptáků pruhy začínají až za ohybem zažátku pera. V minulosti už se tím zabývali různí autoři jako Martinéz et al. (2002), Mlíkovský (1983) nebo Řezníček (1991). Stáří jedinců se dá určit i pomocí opotřebovaných špiček per (Řezníček, ústní sdělení).



Obr. 24: Ocas kalouse ušatého. Vlevo – dospělý jedinec, vpravo – mladý jedinec. Podle Martínéz et al. 2002

6 Závěr

Existuje mnoho studií, které se zabývají sexuálním dimorfismem ptáků. Většina se však zaměřuje na druhy, které mají na první pohled znaky dimorfismu. V posledních letech se rozvinul výzkum ptáků, kteří jsou fenotypově nerozlišitelní, jako jsou například sovy. Tato práce se zabývá studiem pohlavního dimorfismu sov, kalousů ušatých (*Asio otus*). V minulosti se již několik autorů zabývalo studiem pohlavní dvoutvárnosti kalouse, ale žádné studie nevedly ke kvantifikovaným výsledkům.

V hypotéze byla stanovena domněnka, že podle zbarvení peří lze určit pohlaví jedince, studie se proto důkladně zabývá barevností křídélka, sekundární letky a spodní strany křídla.

Přínos této práce je především ve zhodnocení možnosti určování pohlaví kalouse podle jednotlivých částí peří. Druhým významným bodem je vytvoření vzorníku barev, který byl navrhnout zvláště pro různé typy peří. Podle této metody lze jednoduše rozeznat pravděpodobné pohlaví ptáka. Technika je vhodná především do terénu, kdy kroužkovatel určuje pohlaví jedinců bez možnosti genetického ověření.

Z výsledků měřených částí jsem získala tyto poznatky:

1. Křídélko

- RGB hodnoty jsou relevantní pro rozpoznávání pohlaví ptáka.
- Počet tmavých pruhů ne vždy jasně určuje pohlaví kalouse.
- Biometrické měření tmavých pruhů vycházejících od ostnu je neprokazatelné.

2. Sekundární letka

- Měření hodnot RGB barevnosti sekundární letky je spolehlivou a statisticky významnou metodou určování pohlaví kalouse.

3. Vzorník barev

- Vytvořený vzorník barev pro křídélko, sekundární letku a spodní část křídla je vhodný pro určování pohlaví kalouse, přičemž je nutné počítat s tím, že zbarvení určitého procenta jedinců obou pohlaví odpovídá překrývací zóně. V takovém případě je nutné ke spolehlivému určení pohlaví použít další hodnotící prvky.

7 Použitá literatura

- Almasi B., Roulin A., Jenni-Eiermann S., Jenni L. (2008). Parental investment and its sensitivity to corticosterone is linked to melanin-based coloration in barn owls. *Hormon and Behavior*. 54(1): 217-223
- Alonso-Alvarez C., Doutrelant C., Sorci G. (2004). Ultraviolet reflectance affects male-male interactions in the blue tit (*Parus caeruleus ultramarinus*). *Behavioral Ecology*. 15(5): 805–809
- Altmann A. (1972). Přírodniny ve vyučování biologii a geologii. Praha: SPN
- Álvarez J. C., Meseguer J., Meseguer E., Pérez A. (2001). On the Role of the Alula in the steady Flight of Birds. *Ardeola*. 48(2): 191-193
- Andersson M. (1982). Female choice selects for extreme tail length in a widowbird. *Nature*. 299. 818 – 820
- Andersson M. (1994). Sexual Selection. Princeton University Press. 601 s.
- Baker K. (1993). Identification Guide to European Non-Passerines. *British Trust for Ornithology*. 24. 287-290
- Balbotini N. J., Ferrer M., Casado E. (2001). Sex determination in Booted Eagles (*Hieraaetus pennatus*) using molecular procedures and discriminant function analysis. *Journal of Raptor Research*. 35. 20–23
- Bennett A. T. D, Cuthill I. C. (1994). Ultraviolet vision in birds: What is its function?, *Vision Research*. 34(11): 1471–1478
- Brooke M., Birkhead T. R. (1991). The Cambridge Encyclopedia of Ornithology. Cambridge University Press. 362
- Brubaker J. L., Karouna-Renier N. K., Chen Y., Jenko K., Sprague D. T., Henry P. F. (2011). A noninvasive, direct real-time PCR method for sex determination in multiple avian species. *Molecular Ecology Resources*. 11. 415–417
- Burley, N. T., Price, D. K. & Zann, R. A. (1992). Bill color, reproduction and condition effects in wild and domesticated zebra finches. *The Auk*. 109(1): 13–23

- Burns, K. J. (1998). A phylogenetic perspective on the evolution of sexual dichromatism in tanagers (*Thraupidae*): the role of female versus male plumage. *Evolution*. 52(4). 1219–1224
- Bub H. (1991). Bird Trapping and Bird Banding: A Handbook for Trapping Methods All over the World. Ithaca, NY: Cornell University Press. 1991. 330 p.
- Byron J., Downs C. T. (2002). Bird presence at Oribi Airport and recommendations to avoid bird strikes. *South African Journal of Wildlife Research*. 32(1): 49-58
- Cepák, J. 2008: Atlas migrace ptáků České a Slovenské republiky. Vyd. 1. Praha: Aventinum
- Cerit H., Avanus K. (2007). Sex Determination by CHDW and CHDZ Genes of Avian Sex Chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*. 31(6): 371-374
- Chaves-Gonzalez J. M., M. A., Vega-Rodriguez, et al. (2010). Detecting skin in face recognition systems: A colour spaces study. *Digital Signal Processing*. 20(3): 806-823
- D'Alba L., Van Hemert C., Spencer K. A., Heidinger B. J., Gill L., Evans N. P., Monaghan P., Handel C. M., Shawkey M. D. (2014). Melanin-Based Color of Plumage: Role of Condition and of Feathers' Microstructure. *Integrative and Comparative Biology*. 1-12
- Del Mar Delgado M. and Penteriani V. (2004). Gender determination of Eurasian Eagle-Owls (*Bubo bubo*) by morphology. *Journal of Raptor Research*. 38(4): 375-377
- Duellman, W. E., Trueb L. (1994). The biology of amphibians. John Hopkins University Press. 670 s.
- Dunn, P. O. L. A. Whittingham, and T. E. Pitcher. (2001). Mating systems, sperm competition, and the evolution of sexual dimorphism in birds. *Evolution*. 55. 161–175
- Dyck J. (1992). Reflectance Spectra of Plumage Area Colored by Green Feather Pigments. *Auk*. 109(2): 293-301
- Erritzoe J., Fuller R. (1999). Sex differences in winter distribution of Long-eared Owls (*Asio otus*) in Denmark and neighbouring countries. *Vogelwarte*. 40. 80-87

- Evans S., R., Sheldon B., C. (2014). Colour in a new light: a spectral perspective on the quantitative genetics of carotenoid colouration. *Functional Ecology*. 29(1): 96-103
- Flegr, J. (2005): Evoluční biologie. Academia, Praha. 572 s.
- Formánek, J., Škopek, J. (2000). Sovy tažní, nebo stálí ptáci? *Vesmír* 11, 79, 643
- Fox, D. L. (1976). Animal biochromes and structural colors, Berkeley: University of California Press
- Freyer, D. W., Wolpoff, M. H. (1985). Sexual Dimorphism. *Annual Review of Anthropology*. 14. 429 – 473
- Goldsmith T. H. (2008). Co vidí ptáci. *Scientific American*, české vydání. 60-67
- Grande J. M., Negro J. J., Torres M. J. (2004). The Evolution of Bird Plumage Colouration: A Role for Feather- degrading Bacteria? *Ardeola* 51(2): 375-383
- Gray, D. A. (1996). Carotenoids and sexual dichromatism in North American passerine birds. *The American Naturalist*. 148(3). 453–480
- Griffiths R., Double M. C., Orr K., Dawson R. J. G. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*. 7. 1071-1075
- Harris R. E., Davis R. A. (1998). Evaluation of the efficacy of products and techniques for airport bird control. *Transport Canada*. 107
- Hedrick A. V., Temeles E. J. (1989). The evolution of sexual dimorphism in animals: hypotheses and tests. *Trends in Ecology & Evolution*. 5. 136-138
- Hill, G. E. (1992). Proximate basis of variation in carotenoid pigmentation in male house finches. *The Auk*. 109. 1–12
- Hill G. E. (2006). Bird coloration Vol. 1 Mechanisms and measurement. Cambridge, Mass. Harvard University. 597s.
- Hudec K. a Černý W. (1983). Fauna ČSSR 23–24: Ptáci–Aves. Díl III/1–2. Academia. Praha. 94-102
- Hudec K., a kol. (1972). Fauna ČSSR, Ptáci 1, Academia, Praha 540 s.
- Hudec K., a kol. (1994). Fauna ČR a SR, Ptáci 1, Academia, Praha 671 s.

- Hudec K., Balát F., Šťastný K. (2011). Ptáci: Aves. 2. přepracované a doplněné vyd. Academia. Praha.
- Itoh, Y., Suzuki M., Ogawa A., Munechika I., Murata K., Mizuno S. (2001). Identification of the Sex of a Wide Range of Carinatae by PCR Using Primer Sets Selected from Chicken EE0.6 and Its Related Sequences. *The American Genetic Association*. 92(3): 315-321
- Jacobs G. H., Nathans J. (2010). Evoluce barevného vidění primátů. *Scientific American*, české vydání. 4.52-59
- Kleppe K., Otsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA is as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*. 56(2): 341-361
- Kořínek, M. (1999). Zoologická zahrada, RUBICO s.r.o. Olomouc. 300 s.
- Kvítek L., Panáček A. (2007). Základy koloidní chemie. Katedra fyzikální chemie. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Palackého. Olomouc. 52 s.
- LeBoeuf, B. J., Reiter J. (1988). Lifetime reproductive success in northern elephant seals. (v T. H. Clutton a Brock). University of Chicago. 344–362
- Lincoln F. C. (1928). A Bibliography of Bird in America. *The Auk*. 65
- Lundberg A. (1986). Adaptive advantages of reversed sexual size dimorphism in European owls. *Ornis Scandinavica*. 17. 133-140
- Marks, J. S., Evans D. L., Holt D. W. (1994). Long-eared Owl (*Asio otus*). In The Birds of North America. *The Academy of Natural Sciences*. 133
- Martínez, J. A., Zuberogoitia, Í., Alonso, R. (2002). Búho chico northern Long-eared Owl (*Asio otus*). Monticola Ed. Madrid.
- McGraw, K. J., Mackillop, E. A., Dale, J., Hauber, M. E. (2002). Different colors reveal different information: how nutritional stress affects the expression of melanin- and structurally based ornamental plumage', *The Journal of Experimental Biology*. 205(23): 3747–3755

- McGraw, K. J. (2006a). Mechanics of carotenoid-based coloration. *Bird Coloration*. Volume I: Mechanisms and Measurements (eds G. E. Hill & K. J. McGraw). Harvard University Press. Cambridge. 177–242
- McGraw, K. J. (2006b). Mechanics of uncommon colors: pterins, porphyrins and psittacofulvins. *Bird Coloration*. Volume I: Mechanisms and Measurements (eds G. E. Hill & K. J. McGraw). Harvard University Press. Cambridge. 354–398
- Mlíkovský J., Piechocki R. (1983). Biometrische Untersuchungen zum Geschlechtsdimorphismus, einiger mitteleuropäischer Eulen. *Beiträge zur Vogelkunde*. 29(1): 1-11
- Mlíkovský J. (2001). Pohlavní dimorfismus ve velikosti zobáku u sov: srovnání vnějších a oseologických znaků. *Buteo*. 12: 77-80
- Møller A. P. (1998). Female choice selects for male sexual tail ornaments in the monogamous swallow. *Nature*. 332, 640 - 64
- Mueller H. C. (1986). The Evolution of Reversed Sexual Dimorphism in Owls: An Empirical Analysis of Possible Selective Factors. *The Wilson Bulletin*. 98(3): 387-406
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*. 51: 263-73
- Mullis K., and Faloona F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350
- López-López P., Gil J. A., and Alcántara M. (2011). Morphometrics and Sex Determination in the Endangered Bearded Vulture (*Gypaetus barbatus*). *Journal of Raptor Research*. 45(4): 361-366
- Owens I. P. F., Hartley I. R. (1998). Sexual dimorphism in birds: why are so many different forms of dimorphism? Proceedings of the Royal Society. *Biological Science*. 265. 397-407

- Price J. J., Eaton M. D. (2014). Reconstructing the evolution of sexual dichromatism: Current color diversity does not reflect past rate of male and female change. *Evolution*. 68(7): 2026-2037
- Prota G. (1992). Melanins and melanogenesis. San Diego (CA): Academic Press.
- Prum R. O. (1999). Development and Evolutionary Origin of Feathers. *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*. 285 (4): 291–306
- Riegner M. (2008). Parallel Evolution of Plumage pattern and Coloration Birds Implication ofr defining Avian Morphospace. *The Condor*. 110(4): 599-614
- Riley P. A., Land E. J., Ramsden Ch. A. (1997). Melanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 29. 1235-1239
- Ron S. R. (2008). The evolution of female mate choice for complex calls in túngara frogs. *Animal behaviour*. 76. 1783-1794
- Roulin, A., Ducrest, A., L., Balloux, F., Dijkstra, C., Riols, C., Ducrest, A. L., Balloux, F., Dijkstra, C., Riols, C., (2003). A female melanin ornament signals offspring fluctuating asymmetry in the barn owl. *Royal Society*. 270, 167–171.
- Roulin A. (2007). Melanin pigmentation negatively correlates with plumage preening effort in barn owls. *Functional Ecology* 21: 264–271
- Roulin A, 1999a. Delayed maturation of plumage coloration and plumage spottiness in the barn owl (*Tyto alba*). *Journal of Ornithology*. 140:193–197
- Roulin A., Salamin N. (2010). Insularity and the evolution of melanism, sexual dichromatism and body size in the worldwide-distributed barn owl. *Journal of Evolutionary Biology*. 23: 925–934
- Roulin A., Ducrest A., L. (2013a). Genetics of colouration in birds. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 24: 594-608
- Roulin A., Mangles J., Wakamatsu K., Bachmann T. (2013b). Sexually dimorphic melanin-based colour polymorphism, feather melanin content, and wing feather structure in the barn owl (*Tyto alba*). *Biological Journal of the Linnean Society*. 109: 562–573

- Řezníček J. (1981). Ekologie a migrace kalouse ušatého (*Asio otus*, L.). Thesis, Faculty of Science, Charles University, Prague. (Unpublished).
- Řezníček J. (1991). Příspěvek k problematice určování pohlaví kalouse ušatého (*Asio otus*). *Zprávy ČSO*. 33: 12-16
- Sage, B. L. (1962). Albinism and melanism in birds. *British Birds* 55: 201-225
- Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Erlich H. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230: 1350-54
- Salander R. (1966). Sexual Dimorphism and Differential Niche Utilization in Birds. *The Condor*. 68(2): 113-151
- Sheldon B. C., Andersson S., Griffith S. C., Ornborg J., Sendecka J. (1999). Ultraviolet colour variation influences blue tit sex ratios. *Nature* 402:874–876
- Solman V. E. (1976). Aircraft and Birds. Bird control Seminars Proceedings. *The National Research Council*. 55. 82-88
- Stejskal Z., Vermouzek Z. (2004). Ptáci a zákon, aneb, Právní příručka nejen pro ornitologa. Česká společnost ornitologická. 1. Vydání. 74 s.
- Stevens L. (1997). Sex chromosomes and sex determining mechanisms in birds. *Science Progress*. 80. 197-216
- Stoddard M., C., Prum R., O. (2011). How colorful are birds? Evolution of the avian plumage color gamut. *Behavioral Ecology*. 22. 1042 – 1052
- Sonmez G., Sonmez H. B., Shen C. K. F., Wudl F. (2004). Red, Green, and Blue Colors in Polymeric Electrochromics. *Advanced Materials*. 16. 1905-1908
- Šťastný K., Bejček V., Hudec K. (1996). Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice 1985-1989. Ministerstvo životního prostředí České republiky, H&H. 457 s.
- Šťastný K. a kol. (2006). Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice, Aventinum. Praha. 464 s.
- Veselovský Z. (2001). Obecná ornitologie. Akademie. Praha. 358 s.

- Vinther J., Briggs D. G., Prum R. O., Saranathan V. (2008). The colour of fossil feathers. *Biology letters*. 4. 522-525
- Weidensaul C. S., Colvin B. A., Brinker D. F., HUY S. (2011). Use of Ultraviolet Light as an Aid in Age Classification of Owls. *The Wilson Journal of Ornithology*. 123(2): 373–377
- Whitworth D., Newman S., Mundkur T., Harris P. (2007). Wild Birds and Avian Influenza. An introduction to applied field research and disease sampling techniques. *FAO Animal Production and Health Manual*. 44-48
- Wijnandts H. (1984). Ecological energetics of the Long-eared Owl, (*Asio otus*). *Ardea*. 72: 1-92
- Wide H. (1970). Osteologische Untersuchungen an eigen deutschen Eulenarten. *Zoologische Abhandlungen aus dem staatlichen Museum für Tierkunde in Dresden*. 30(12): 149-157
- Wide H. (1977). Verlaichende Untersuchungen über Proportionarlität und sexualdimorphismus im skelet von *Asio otus*. *Zoologische Abhandlungen aus dem staatlichen Museum für Tierkunde in Dresden*. 34(9): 143-146
- Winker K. (1998). Suggestions for Measuring External Characters of Birds. *The neotropical Ornithological Sociest*. 9. 23-30
- Zima J., Macholán M., Munclinger P., Piálek J. (2004). Genetické metody v zoologii. Karolinum. Praha. 126-136
- Zmeškal O., Sedlák O., Nezadal M. (2002). Metody obrazové analýzy dat, Digital Imaging in Biology and Medicine, Czech Academy of Science České Budějovice. 5. 34 - 43

7.1 Internetové zdroje

<http://www.owlinstitute.org/long-eared-owl.html> 22.8.2014

<http://www.shannonryanart.com/cablog/tag/blood-feathers/> 13.2.2014

<http://www.karymullis.com/pcr.shtml> 2.3.2015

<http://www.nm.cz/Prirodovedecke-muzeum/Oddeleni-PM/Krouzkovaci-stanice/Historie-1/>
11.3.2015

<http://seen-net.eu/index.php?id=31a> 25.3.2015

<http://seen-net.eu/index.php?id=28b> 25.3.2015

<http://www.ornis.cz/> 15.4. 2015

<http://www.lhmp.cz/eko/o-nas/zachranna-stanice-hl-m-prahy/> 28.4.2015

7.2 Zákoné normy

Zákon č. 114/1992 Sb. o ochraně přírody a krajiny

Zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání

8 Seznam použitých zkratk

ASIP	agouti-signaling-protein
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCD	Charge Coupled Devices
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductors
DNA	deoxyribonukleová
MC1R	melanokortinový-1 receptor
MITF	transkripční fakto
MSH	melanocyty stimulující hormon
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
SDS	dodecylsírán sodný
TAE	tri-acetátový pufr

9 Seznam obrázků

Obr. 1: Kalous ušatý (<i>Asio otus</i>). Foto: www.owlinstitute.org	12
Obr. 2: Model peří, na kterém lze pozorovat změny ve stavbě těla a zbarvení. Podle: Reigner, 2008	19
Obr. 3 (a)Míchání základních barev v RGB modelu. (Chaves-Gonzalez, Vega-Rodriguez et al. 2010), (b) RGB model znázorněn jednotkovou krychlí v Kartézské soustavě souřadnic.	26
Obr. 4: Počátky odchytu ptáků do sítí. Podle: Bub, 1991	29
Obr. 5: Grafické znázornění nárazové sítě. Podle: Whitworth et al. 2007	30
Obr. 6: Hlášení kroužkovací stanice o kroužkovaném ptáku.	32
Obr. 7: Detail hlavy kalouse ušatého v zajetí. Foto: Hlasivcová.....	35
Obr. 8: Detail špičky letek kalouse ušatého v zajetí. Foto: Hlasivcová	35
Obr. 9: Odchyt kalouse ušatého do nárazové sítě. Foto: Hlasivcová	41
Obr. 10 : Odchyt kalouse ušatého do nárazové sítě. Foto: Hlasivcová	41
Obr. 11: Křídélko.....	43
Obr. 12: Porovnání sytosti barvy. Vlevo – samice, vpravo – samec. Podle: Martínez et al., 2002	44
Obr. 13: Analýza barev na sekundární letce v programu Photoshop.	45
Obr. 14: Analýza barev RGB na křídélku v programu Photoshop.	46
Obr. 15: Detail brku pera. Foto: www.shannonryanart.com	48
Obr. 16: Výsledek gelové elektroforézy z krycího peří.....	49
Obr. 17: Vzorník barev sekundární letky.	67
Obr. 18: Vzorník barev sekundární letky.	69
Obr. 19: Vzorník barev vnitřní části křídla.....	71
Obr. 20: Porovnání barevnosti křídélka. Nahoře - samice,	75
Obr. 21: Porovnání barevnosti sekundární letky. Vlevo – samec, vpravo – samice. Foto: Hlasivcová	76
Obr. 22: Porovnání barevnosti vnitřní části křídla.	77
Obr. 23: Nohy kalousů ušatých. Vlevo – samec, vpravo – samice. Foto: Hlasivcová.....	78

Obr. 24: Ocas kalouse ušatého. Vlevo – dospělý jedinec, vpravo – mladý jedinec. Podle Martínez et al. 2002	79
---	----

10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Znázornění RGB hodnot u jednotlivých barev.	26
Tabulka 2: Čísla označují kadávery, kroužky označují žijící jedince. Přehled jednotlivých vzorků určených podle analýzy DNA.	54
Tabulka 3: Hodnoty získané biometrickým měřením křídélka.	55
Tabulka 4: Celkové znázornění výsledných hodnot RGB na sekundární letce.....	58
Tabulka 5: Souhrnné znázornění výsledných hodnot RGB na křídélku.	64
Tabulka 6: Obsazenost stupňů sytosti barev sekundární letky u samců a samic.....	68
Tabulka 7: Obsazenost stupňů sytosti barev křídélka u samců a samic.	69
Tabulka 8: Obsazenost stupňů sytosti barev vnitřní části křídla u samců	71

11 Seznam grafů

Graf 1: Celkový poměr počtu pohlaví kalouse ušatého.....	52
Graf 2: Celkové znázornění biometrického měření křídélka.....	56
Graf 3: Celkové znázornění měření RGB na sekundární letce.....	59
Graf 4: Znázornění měření RGB čtvrtého bodu pod tmavým pruhem z vnější části od ostnu na sekundární letce.	60
Graf 5: Znázornění měření RGB pátého bodu pod tmavým pruhem z vnější části od ostnu na sekundární letce.	61
Graf 6: Znázornění měření RGB čtvrtého bodu pod tmavým pruhem z vnitřní části od ostnu na sekundární letce.....	62
Graf 7: Znázornění měření RGB pátého bodu pod tmavým pruhem z vnitřní části od ostnu na sekundární letce.	63
Graf 8: Znázornění měření RGB pod druhým tmavým pruhem z vnější části od ostnu na křídélku.....	65

Graf 9: Znázornění měření RGB ve dvou třetinách pera z vnější části od ostnu na křídélku.	66
Graf 10: Grafické znázornění obsazenosti stupňů sytosti barev sekundární letky u samců a samic.....	68
Graf 11: Grafické znázornění obsazenosti stupňů sytosti barev křídélka u samců a samic.	70
Graf 12: Grafické znázornění obsazenosti stupňů sytosti barev apodní strany křídla u samců a samic.	72